



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**AMBIENTAL**

**“ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DEL ANHÍDRIDO  
CARBÓNICO EN UN TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE SUELOS  
PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS”**

**TESIS DE GRADO**

**Previa la obtención del título de:**  
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**Presentado por:**  
**GHINSON ADRIAN GUEVARA PINCAY**

**RIOBAMBA-ECUADOR**

**2014**

## **Dedicatoria**

*A ti madre que desde el cielo me cuidas y me guías.*

*A ti padre, por tu ejemplo de trabajo y honradez.*

*Los frutos de su esfuerzo están aquí.*

*Ghinson Adrian Guevara Pincay*

## **Agradecimiento**

*En primer lugar agradezco a Dios,  
por permitirme culminar esta etapa de mi vida.*

*A la*

*Dra. Nancy Veloz - Directora de Tesis  
y al miembro del tribunal Dr. Iván Ramos,  
quienes aportaron para la culminación  
de este trabajo de investigación.*

*A mis hermanos siempre presentes y a todos  
los que voluntariamente tuvieron parte primordial  
y necesaria para culminar este proyecto de tesis.*

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DEL ANHÍDRIDO CARBÓNICO EN UN TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE SUELOS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS.”**, de responsabilidad del señor egresado: Ghinson Adrian Guevara Pincay, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Cesar Avalos. DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dra. Nancy Veloz DIRECTOR DE ESCUELA	-----	-----
Dra. Nancy Veloz DIRECTORA DE TESIS	-----	-----
Dr. Iván Ramos MIEMBRO DE TRIBUNAL	-----	-----
Ing. Eduardo Tenelanda DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----

NOTA DE TESIS

Yo, Ghinson Adrian Guevara Pincay soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

**GHINSON ADRIAN GUEVARA PINCAY**

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>CESTTA</b>	Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental
<b>ESPOCH</b>	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
<b>PRAS</b>	Proyecto de reparación ambiental y social
<b>RAHOE</b>	Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas
<b>TPH's</b>	Hidrocarburos Totales de Petróleo
<b>HAPs</b>	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>API</b>	American Petroleum Institute
<b>OCP</b>	Oleoducto de Crudos Pesados
<b>SOTE</b>	Sistema de Oleoducto Transecuatoriano
<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>COV's</b>	Compuestos Orgánicos Volátiles
<b>SO<sub>2</sub></b>	Gases de azufre
<b>CO</b>	Monóxido de carbono

<b>NO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Nitrógeno
<b>SO<sub>2</sub></b>	Óxidos de azufre
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>C</b>	Carbono
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>Ba(OH)<sub>2</sub></b>	Hidróxido de bario
<b>LiOH</b>	Hidróxido de litio
<b>NO</b>	Oxido de nitrógeno
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>NDIR</b>	Método no dispersivo
<b>IR</b>	Detector de radiación
<b>BaCl</b>	Cloruro de bario
<b>HCl</b>	Acido Clorhídrico
<b>Ha (s)</b>	Hectárea (s)
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>S.S.N.N.</b>	Sin nombre
<b>INAMHI</b>	Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología

<b>SA</b>	Sacha
<b>hPa</b>	Presión
<b>%Hr</b>	Porcentaje de humedad
<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>GPS</b>	Sistema de posicionamiento global
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo
<b>MAP</b>	Fosfato monoamónico
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias



## **INDICE GENERAL**

<b>PORTADA .....</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>INDICE GENERAL .....</b>	<b>IX</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>INDICE DE FOTOGRAFÍAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>INDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>XVI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XVII</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>4</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
1.1. El Suelo .....	4
1.2. Tratamiento Biológico de Suelos .....	5
1.3. Características de los Suelos .....	6
1.4. Suelos Contaminados .....	7
1.5. Biorremediación .....	8
1.5.1. Tecnologías de Biorremediación.....	9
1.5.2. Pruebas de factibilidad .....	10
1.6. Biopilas.....	12
1.6.1. La técnica de Biopilas .....	12
1.6.2. Principios básicos.....	15

1.6.3.	Factores a considerar.....	16
1.6.4.	Etapas del proceso.....	18
1.6.5.	Ventajas y desventajas de la biorremediación .....	20
1.6.6.	Limitaciones de la biorremediación .....	20
1.7.	El Petróleo .....	21
1.7.1.	Sistemas de extracción de petróleo .....	23
1.7.1.1.	Método de rotación.....	23
1.7.1.2.	Encamisado .....	24
1.7.1.3.	Aprovechamiento del yacimiento.....	24
1.7.1.4.	Bombeo del petróleo .....	25
1.7.1.5.	Inyección de agua .....	25
1.7.1.6.	Inyección de vapor .....	26
1.7.1.7.	Extracción en el mar.....	26
1.7.2.	Tipos de petróleo.....	27
1.7.2.1.	Clasificación del petróleo según su gravedad api.....	27
1.7.2.2.	El petróleo en el Ecuador .....	28
1.8.	Puntos críticos donde se puede producir los derrames.....	28
1.8.1.	Derrames petroleros registrados en el Ecuador.....	29
1.9.	Hidrocarburos .....	30
1.9.1.	Biodegradación del petróleo .....	32
1.9.2.	Descontaminación del suelo.....	37

1.9.3.	Impactos ambientales provocados por el petróleo .....	38
1.10.	Reglamento al cual se va a regir el proyecto .....	40
1.11.	El Carbono .....	41
1.12.	Capacidad de degradación de hidrocarburos totales de petróleo por los microorganismos del consorcio nativo .....	44
1.13.	El CO <sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana.....	46
1.14.	Cinética bacteriana.....	47
<b>CAPITULO II .....</b>		<b>49</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
2.1.	Lugar de la investigación .....	49
2.2.	Materiales utilizados.....	53
2.2.1.	Suelo contaminado .....	53
2.2.2.	Equipos.....	53
2.3.	Muestreo .....	54
2.3.1.	Método de muestreo .....	54
2.3.2.	Tamaño de la Muestra.....	54
2.4.	Metodología.....	55
2.5.	Diseño Experimental .....	58
2.6.	Métodos .....	59
<b>CAPITULO III.....</b>		<b>60</b>
<b>3.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>60</b>
3.1.	Activación de las Bacterias en la Biopila .....	60
3.1.1.	Materiales equipos y reactivos .....	60
3.1.2.	Procedimiento .....	61

<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>62</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
4.1. Mediciones de CO <sub>2</sub> en la biopila para determinar el grado de actividad de las bacterias para la reducción de TPH's.....	62
4.2. Mediciones de CO <sub>2</sub> en función de la temperatura .....	63
4.3. Mediciones de CO <sub>2</sub> en función de los TPH's por semana .....	65
4.4. Crecimiento bacteriano (UFC) semanal .....	69
<b>CAPITULO V.....</b>	<b>72</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>72</b>
5.1. Conclusiones .....	72
5.2. Recomendaciones .....	74
<b>CAPITULO VI.....</b>	<b>1</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>1</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>1</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las partículas de un suelo.....	5
Tabla 2. Parámetros a considerar y sus rangos óptimos durante un proceso de composteo para el tratamiento de suelos contaminados por compuestos orgánicos.....	16
Tabla 3. Cuadro resumen impactos ambientales .....	39
Tabla 4. Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios. <sup>(7)</sup> .....	40
Tabla 5. Diseño de la Investigación .....	59
Tabla 6. Métodos de Análisis.....	59
Tabla 7. Mediciones de CO <sub>2</sub> (ppm) y temperatura (°C) durante el mes de investigación.....	62
Tabla 8. Mediciones de CO <sub>2</sub> (ppm) y TPH's (mg/kg) durante el mes de investigación.....	66
Tabla 9. Crecimiento bacteriano.....	69

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas.....	14
Figura 2. Representación esquemática de un sistema de biopilas estáticas .....	14
Figura 3. Remoción de materia orgánica y perfiles de temperatura durante el proceso de composteo. ....	19
Figura 4. Cuencas sedimentarias donde existe petróleo.....	21
Figura 5. Derivados del petróleo .....	22
Figura 6. Extracción de petróleo .....	23
Figura 7. Equipo rotatorio .....	24
Figura 8. Desplazamiento del petróleo por agua.....	26
Figura 9. Representaciones del metano.....	30
Figura 10. Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo.....	31
Figura. 11. Sensor NDIR (diseño compacto) para medir CO <sub>2</sub> .....	44
Figura 12. Proceso de biodegradación de hidrocarburos .....	45
Figura 13. Crecimiento de una población bacteriana.....	48
Figura 14. Localización del campo Sacha .....	51
Figura 15 y 16. Localización del área utilizada para las mediciones de CO <sub>2</sub> .....	52
Figura 17. Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas.....	61
Figura 18. CO <sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 1 .....	63
Figura 19. CO <sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 2. ....	64
Figura 20. CO <sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 3 .....	64
Figura 21. CO <sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 4 .....	65
Figura 22. CO <sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 1 .....	66
Figura 23. CO <sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 2 .....	67
Figura 24. CO <sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 3 .....	67
Figura 25. CO <sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 4.....	68
Figura 26. Crecimiento bacteriano semana 1 .....	69
Figura 27. Crecimiento bacteriano semana 2 .....	69
Figura 28. Crecimiento bacteriano semana 3 .....	70
Figura 29. Crecimiento bacteriano semana 4.....	70
Figura 30. Curvas de crecimiento bacteriano inicial y final .....	71

## **INDICE DE FOTOGRAFÍAS**

Fotografía 1. Equipos de monitoreo .....	53
Fotografía 2. Ubicación de los puntos de muestreo.....	56
Fotografía 3. Medición de los datos.....	57
Fotografía 4. Volteo de la Biopila .....	57

## **INDICE DE ANEXOS**

ANEXO 1. INFORMES DE RESULTADOS.....	79
ANEXO 2. FOTOGRAFÍAS.....	83
ANEXO 3. DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO DE REMEDIACIÓN DE SACHA 161.....	84
ANEXO 4. MAPA DEL LUGAR EN ESTUDIO.....	85



## RESUMEN

La investigación se desarrolló en la Provincia de Orellana cantón Joya de los Sachas pozo SA 161, se basa en Estudiar la cinética de degradación de hidrocarburos en un tratamiento biológico, utilizando mediciones de concentración de CO<sub>2</sub> para evaluar la eficiencia del tratamiento.

El suelo contaminado para el estudio de mediciones de CO<sub>2</sub> se dispuso en biopilas de remediación. Los equipos empleados son: Testo X 435 para medir valores de: temperatura (°C), presión (hPa), humedad (%Hr), CO<sub>2</sub> (ppm) y un GPS para geo referenciar los puntos donde se realizan las mediciones. El monitoreo realizado consta de caracterizar inicialmente el sitio a remediarse como línea base que se muestrea cada seis meses con mediciones diarias de CO<sub>2</sub> en seis puntos de la biopila y una sola medición en un blanco. Para facilitar la medición de CO<sub>2</sub> y obtener los resultados esperados, se activa añadiendo por medio de aspersión una bacteria nativa conjuntamente con urea y material esponjante MAP (fósforo). Se aplicó el muestreo probabilístico, completamente aleatorizado para “n” iguales, sobre una Biopila de 2793m<sup>3</sup>, en la cual se colocaron tubos muestreadores distribuidos aleatoriamente alrededor de la misma.

Los resultados obtenidos respecto a la degeneración de CO<sub>2</sub> por la actividad microbiana presentó un rango variable de concentración con un mínimo de 336 ppm y un máximo de 2824 ppm y una eficacia del 72,03% de degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH's) en cuatro semanas con un valor final de 1336,37 mg/kg.

Se concluye que el estudio de la cinética de degradación de hidrocarburos totales de petróleo permite mediante la medición diaria de CO<sub>2</sub> evaluar la eficacia del tratamiento biológico, utilizando técnicas de biopilas con inoculación de bacterias nativas. Se recomienda realizar una caracterización de las condiciones iniciales del suelo contaminado cada seis meses para determinar parámetros de cantidad de nutrientes, características físicas y riqueza microbiológica, con el fin de controlar posibles desviaciones al proceso de biorremediación.

## SUMMARY

This research was conducted in Orellana Province, Joya de los Sachas SA 161 borehole, it is based on the kinetics study of hydrocarbon degradation in a biological treatment using CO<sub>2</sub> concentration measurements to evaluate the treatment efficiency.

The contaminated soil for CO<sub>2</sub> measurement study was provided in remediation biopiles. The equipment used are: X 435 Testo to measure values such as: temperature (°C), pressure (hPa), humidity (%Hr), CO<sub>2</sub> (ppm) and a GPS for geo referencing the points where the measurements are made. Monitoring conducted initially comprises characterizing the site to be remedied as a base line which is sampled every six months with daily CO<sub>2</sub> measurements in six points of the biopile and a single measurement of a target. In order to facilitate CO<sub>2</sub> measurement and obtain the expected results, a native bacteria spray together with urea and MAP (phosphorus) blowing material is activated by adding it through sprinkling. The probability sampling was applied completely randomized for “n” equal, on a 2793m<sup>3</sup> biopile, where sampler tubes were placed randomly around it.

The results regarding CO<sub>2</sub> degeneration by microbial activity showed a variable range of 336 ppm minimum concentration and 2824 ppm maximum and an efficiency of 72,03% of petroleum total hydrocarbons (TPH's) in four weeks with a 1336,37 mg/kg final value.

It is concluded that the petroleum total hydrocarbons degradation kinetics enables to evaluate the biological treatment efficiency through the daily CO<sub>2</sub> measurement, using biopiles techniques with native bacteria inoculation. It is recommended to perform a characterization of the contaminated soil initial conditions every six months to determine nutrients quantity parameters, physical characteristic and microbiological wealth, in order to monitor possible deviations in the bioremediation process.

## INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, desde las primeras misiones de exploración de yacimientos petrolíferos, en el siglo XIX, en los años 20, las áreas de influencia directa e indirecta de la explotación hidrocarburífera, han sido impactadas en los componentes sociales y ambientales. En la actualidad, aún se encuentran presentes impactos ambientales persistentes y en algunos casos, recurrentes, especialmente los pasivos ambientales y derrames de crudo, que por su abandono se convierten en fuentes de contaminación, siendo así, parte de la problemática socio-ambiental que afecta a la Amazonía Ecuatoriana. (Petroecuador, 2007)<sup>(8)</sup>

Actualmente, debido a la colonización que ha sufrido la Amazonía Ecuatoriana todos estos pasivos ambientales se encuentran en centros poblados, zonas agrícolas y ganaderas, propiedades privadas, etc., causando problemas ambientales mayores tales como: contaminación del agua para consumo humano y de uso agropecuario debido al transporte y transformación de contaminantes, malos olores, infertilidad del suelo, impacto visual por afectación al paisaje, pérdida de animales de granja, enfermedades de la piel, trastornos gástricos, cefaleas severas, aumento en la probabilidad del desarrollo de enfermedades cancerígenas, entre otras.

Con el paso del tiempo científicos académicos e industriales determinaron que algunos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar los hidrocarburos como alimento y fuente de energía. Posteriormente, algunas investigaciones demostraron que estos microorganismos eran los principales responsables de la descomposición de aceites en el suelo aumentando su actividad metabólica.

En nuestro país los habitantes de la Amazonía han exigido que las compañías petroleras eliminen la contaminación ambiental que han generado y que se les dé compensación por los daños ocasionados por la contaminación relacionada con la extracción de petróleo.

No obstante, las medidas adoptadas hasta el momento por las compañías petroleras y las diversas administraciones del gobierno nacional ecuatoriano han sido tildadas de

“parches”, aplicando medidas tales como cubrir algunas fosas de desechos, edificar escuelas y construir caminos, pero ninguna ataca el problema desde la raíz.

Con este punto de vista y enfoque, nace la necesidad de aplicar técnicas de remediación que sean benévolas con el medio ya afectado y en lo posible evite la incorporación de agentes que no son propios del lugar y que pueden causar alguna alteración en la biota del sitio a recuperar; considerando las características antes mencionadas la biorremediación es la técnica que más se ajusta y es económicamente factible.

Desde hace varias décadas la explotación de los hidrocarburos ha sido una prioridad y una oportunidad de desarrollo del país, particularmente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, y Esmeraldas donde se ha concentrado los procesos de extracción, refinación, transporte y comercialización del petróleo, son los lugares donde se registran mayores problemas de contaminación de suelos por hidrocarburos.<sup>(18)</sup>

En la flora y la fauna la fijación de las pasturas depende de la presencia de arbustos y matorrales, que son los más afectados por la contaminación con hidrocarburos. Dentro de la fauna, las aves son las más afectadas, por contacto directo con los cuerpos de agua o vegetación contaminada, o por envenenamiento por ingestión. El efecto sobre las aves puede ser letal. Si la zona de explotación es costera o mar adentro el derrame de hidrocarburos produce daños irreversibles sobre la fauna marina.<sup>(14)</sup>

Para la eliminación de estos pasivos ambientales el Ministerio del Ambiente a través de la Unidad del Equipo Gestor del PRAS convoca a las Universidades y Escuelas Politécnicas calificadas en el registro de ejecutores de proyectos de remediación ambiental en los campos petroleros de Auca, Sacha, Libertador, Shushufindi y Lago Agrio.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a través del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), lleva a cabo la Caracterización y Remediación del derrame en la Línea de Flujo del Pozo Sacha 161,

ubicado en el Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana, en las coordenadas: Longitud: 76° 52' 57" W Latitud: 0° 18' 21" S, la contaminación de esta área fue producida por dos rupturas en la línea de flujo en el año 2007 en una extensión aproximada de 1,25 hectáreas.

En la presente investigación se han planteado los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar la cinética de degradación de hidrocarburos en un tratamiento biológico, utilizando mediciones de concentración de CO<sub>2</sub> para evaluar la eficiencia del tratamiento.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo sujeto a remediación mediante la aplicación de la técnica de biopilas con adición de bacterias nativas.
- Cuantificar la cantidad de anhídrido carbónico emitido por la actividad de los microorganismos en la biorremediación del suelo.
- Establecer la relación existente entre la temperatura y el CO<sub>2</sub> generado por la actividad microbiana durante el proceso de biorremediación.
- Determinar la eficacia del proceso de biorremediación aplicando la técnica de biopilas con adición de bacterias nativas mediante la evaluación del porcentaje de degradación de hidrocarburos totales de petróleo.

## **CAPITULO I**

### **1. MARCO TEÓRICO**

#### **1.1. El Suelo**

La palabra suelo se deriva del Latín Solum que significa piso o superficie de la tierra. Edafológicamente, el suelo se define como un cuerpo natural, formado a partir de una mezcla variable de minerales meteorizados y de materia orgánica en descomposición, que cubre la tierra en una capa delgada, y que cuando contiene cantidades apropiadas de agua y de aire ofrece soporte mecánico y sustento para las plantas.

El suelo está formado por tres fases: la líquida, la sólida y la gaseosa. En la mayor parte de los suelos la fase sólida la forman partículas minerales que constituyen el esqueleto estructural en el que está adsorbido el humus o las partículas orgánicas. Entre las partículas de la fase sólida existen espacios porosos. Los espacios porosos son llenados con la fase líquida y gaseosa juntamente.

La fase líquida, consiste principalmente, en agua procedente de las precipitaciones, existiendo como películas que rodean los espacios porosos más pequeños. Los espacios porosos más grandes, a más que el suelo este saturado de agua, los llenan los grandes. Entre el suelo y la atmósfera se efectúan intercambio de gases. Las

actividades biológicas como la respiración y la descomposición de la materia orgánica consumen oxígeno y producen dióxido de carbono. Como consecuencia de ello, hay una continua difusión del oxígeno de atmósfera al suelo y de bióxido de carbono del suelo a la atmósfera.

Medios porosos formados en la superficie terrestre mediante el proceso de meteorización durante largos períodos, aportados por los fenómenos biológicos, geológicos e hidrológicos. Los suelos se consideran como sistemas biogeoquímicos multicomponentes y abiertos, están sometidos a los flujos de masa y energía con la atmósfera, la biosfera y la hidrosfera, su composición es altamente variable y también cambia con el tiempo. Además el suelo es un sistema dinámico de 3 componentes: partículas minerales, detritos y organismos que se alimentan de éstos.<sup>(23)</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de las partículas de un suelo.

Tipo de partícula	Diámetro, mm	Área específica, m <sup>2</sup> /kg
Arena		
Gravilla	1,0 – 2,0	1,1
Arena gruesa	0,5 – 1,0	2,3
Arena media	0,25 – 0,5	4,5
Arena fina	0,1 – 0,25	9,1
Arena muy fina	0,05 – 0,1	22,7
Limo	0,002 – 0,05	45,4
Arcilla	< 0,002	1130,0

Fuente: Millar *et al.*, 1958

**Fuente:** Millar et al., 1958

## 1.2. Tratamiento Biológico de Suelos

El tratamiento biológico de suelos contaminados involucra el uso de microorganismos y/o vegetales para la degradación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua, y compuestos celulares. Los procesos biológicos se

aplican frecuentemente al tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Se pueden aplicar técnicas in-situ (en el lugar donde se encuentra el suelo contaminado) o ex-situ (cuando el suelo se traslada a una instalación para su tratamiento). El tratamiento ex-situ de suelos, sedimentos y otros sólidos contaminados con hidrocarburos se puede realizar en un variado número de procesos en fase sólida y en fase lodo. Los procesos en fase sólida son aquellos en donde el suelo se trata con un contenido de agua mínima. En el caso de los procesos en fase lodo se suspende el suelo en agua (LaGrega et al, 1996).

Una ventaja de los procesos en fase sólida es que las bajas velocidades de transferencia de materia permiten trabajar a niveles de contaminación que serían tóxicos para los microorganismos si se realizaran en fase líquida. Por otro lado los sistemas sólidos son capaces de sustentar el crecimiento de microorganismos que no desarrollan bien en fase líquida (hongos) y producen complejos enzimáticos capaces de oxidar compuestos complejos (Cookson, 1995).

Los parámetros críticos a considerar en un tratamiento biológico son: tipo y concentración del contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, aireación, condiciones macro ambientales, presencia de inhibidores y biodisponibilidad del contaminante.

### **1.3. Características de los Suelos**

Cada suelo se caracteriza por sus propiedades físicas y químicas. El conocimiento de las características físico-químicas de un suelo, nos permite prever la dinámica de las sustancias contaminantes:

- a. LA POROSIDAD: Condiciona la movilidad de los compuestos solubles y de los volátiles.
- b. LA TEMPERATURA: De ella dependen los procesos de alteración de los materiales originarios o la difusión de los contaminantes.
- c. LOS PROCESOS ÁCIDO-BASE: Influyen en el grado de descomposición de la materia orgánica y de los minerales, en la solubilidad de algunos contaminantes y en conjunto, los procesos controlados por el pH del suelo.



- d. LAS REACCIONES REDOX: Originados en el metabolismo de los microorganismos del suelo, afectan a elementos naturales y contaminantes.
- e. LAS PROPIEDADES COLOIDALES: Explican los procesos de agregación e inmovilización de partículas.
- f. LAS INTERACCIONES SUPERFICIALES: Como por ejemplo la adhesión entre componentes del suelo y otros compuestos ya sean naturales o contaminantes.
- g. LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO IÓNICO: Corresponde a la cantidad de iones metálicos que una determinada cantidad de suelo es capaz de intercambiar. Estos intercambios son vitales para que los iones metálicos pueden acceder a la planta.

#### **1.4. Suelos Contaminados**

Todo aquel cuyas características físicas, químicas y biológicas naturales, han sido alteradas debido a actividades antropogénicas y representa un riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

También se entiende como suelo contaminado, según muchos organismos internacionales, aquel que represente una amenaza para la salud humana y el medio ambiente, debido a las sustancias presentes en o bajo el suelo, generalmente debido a un mal uso previo. Además se puede decir que un sitio contaminado según Moraga (2003) es “aquel con presencia de componentes que no son atribuibles a la condición natural del sitio”.

La introducción de contaminantes o material exógeno al suelo puede traducirse en un daño o pérdida de algunas o varias de las funciones antes mencionadas, repercutiendo directamente en la calidad del suelo y su función. Además no solo perjudica al suelo, sino también puede tener implicancias en aguas superficiales y subterráneas al ser arrastrados los contaminantes de ese lugar ya sea por medio de lluvias o simple infiltración. Además la presencia de contaminantes por sobre ciertos niveles implica múltiples consecuencias negativas para la cadena alimenticia y por lo tanto para la salud humana. La problemática comenzó a fines del siglo XIX, con la revolución industrial, pues una de las principales fuentes de contaminación fueron las

instalaciones industriales tanto en operación como después de su cierre, las que causaron derrames y filtraciones, tanto por accidentes o debido al mal manejo de las operaciones.

Se pueden relacionar algunas actividades industriales con los contaminantes comúnmente encontrados en sus instalaciones, entre ellas se puede mencionar la asociación de industrias como la producción de gas desde carbón, manufactura de cueros y pieles, estaciones de servicio y refinerías de petróleo, entre otras, a la presencia de hidrocarburos como contaminantes.

### **1.5. Biorremediación**

Se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos.

Los procesos biológicos que involucran enzimas como catalizadores, pueden modificar moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura así como en sus propiedades toxicológicas incluso, dar como resultado la completa conversión de dichos compuestos en productos inorgánicos como agua, CO<sub>2</sub> o formas inorgánicas de N, P y S; además de componentes celulares y productos de las rutas metabólicas (mineralización).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio (autóctonos) o ajenos a éste (exógenos), y llevarse a cabo en condiciones aerobias o anaerobias. Al igual que otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede realizarse en el mismo sitio sin necesidad de excavar el material contaminado (in situ), o bien excavando el material para tratarlo en el sitio (on - site) o fuera de él (ex situ).

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados por hidrocarburos totales del petróleo (HTP), solventes, explosivos, cloro fenoles, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

En general existen dos estrategias para ayudar a un ecosistema a remediarse: la primera es agregar nutrientes de forma de estimular las poblaciones naturales y así aumentando su actividad y la segunda es introduciendo microorganismos exógenos dentro del ecosistema como forma de remediación.<sup>(5)</sup>

### **1.5.1. Tecnologías de Biorremediación**

La biorremediación de suelos puede llevarse a cabo in situ, o bien, el material puede ser excavado y tratado ex situ. La principal ventaja de los tratamientos in situ es que permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar, dando como resultado una disminución en costos.

Sin embargo, este tipo de tratamientos generalmente requiere de periodos de tratamiento largos y es menos seguro en cuanto a la uniformidad del tratamiento debido a la heterogeneidad propia del suelo. Las tecnologías de biorremediación in situ, incluyen:

- El bioventeo.- Consiste en estimular la biodegradación aerobia de un contaminante por medio del suministro de aire en el sitio contaminado.
- La bioaumentación.- Consiste en la adición de microorganismos vivos que tienen la capacidad de degradar el contaminante en cuestión y así promover su biodegradación o biotransformación.
- La bioestimulación.- Implica la adición de oxígeno y/o nutrientes al suelo contaminado con el fin de estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y con ello la biodegradación de los contaminantes.
- La biolabranza.- El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve (labra) periódicamente para favorecer su aireación. Durante la biolabranza, el suelo contaminado se mezcla con suelo limpio.
- Fitorremediación.- Es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos o sedimentos.<sup>(11)</sup>

La principal ventaja de las tecnologías ex situ, es que generalmente requieren de periodos más cortos que los anteriores, son más seguros en cuanto a la uniformidad del tratamiento, ya que el sistema puede homogeneizarse y mezclarse continuamente. Otra ventaja, es que los productos permanecen dentro de la unidad de tratamiento hasta la obtención de productos no peligrosos. Sin embargo, los tratamientos ex situ requieren de la excavación del suelo.

Las tecnologías de biorremediación ex situ, incluyen:

- Procesos de composteo (biopilas, Landfarming) ó Biodegradación en fase sólida. Este tipo de tecnología generalmente se lleva a cabo ex situ, e incluye el composteo, las pilas estáticas y las pilas alargadas, proceso que se describe con detalle más adelante.
- Uso de biorreactores (de lodos y en fase sólida).- Es la tecnología más adecuada para casos en que los peligros potenciales de descargas y emisiones sean serios. Permite la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación.<sup>(14)</sup>

### 1.5.2. Pruebas de factibilidad

Antes de empezar un proyecto de biorremediación es preferible realizar un estudio de factibilidad para caracterizar las propiedades específicas del sitio. Estas pruebas ayudan a optimizar las condiciones para el manejo técnico del proyecto, y también son importantes para evitar “sorpresas” que puedan complicar el proyecto, haciéndolo más tardado y costoso.

La caracterización de las propiedades físico-químicas del material (suelo, lodo, sedimento) a tratar y del contaminante, que consiste en la determinación de varias propiedades importantes para la biorremediación, tales como:

- **Tipo de hidrocarburos:** Es más fácil realizar pruebas para tratar combustibles, lubricantes, petróleo y crudo, y resulta difícil cuando se trata de aceite hidráulico, hidrocarburos muy viscosos, o hidrocarburos contaminados con otros compuestos (como metales, plaguicidas, etc.).

- **Tipo de material:** Se trabaja mejor con materiales de textura mediana o franca, con alto contenido de materia orgánica. No es aconsejable materiales muy arcillosos.
- **pH:** Se puede manejar un pH de 4 a 6 sin mucho problema si se utilizan bacterias nativas. En la mayoría de suelos un pH de 6 a 8 es más adecuado.
- **Salinidad:** Puede variar mucho. Si está en una zona de manglares debe de usar bacterias nativas, las cuales son adaptadas a las condiciones.
- **Aireación:** Es importante mantener condiciones aerobias debido a que las tasas de biodegradación en condiciones anóxicas son aproximadamente 50 a 100 veces menores. Esto se logra utilizando un buen sistema de drenaje, y aireando el suelo frecuentemente (mínimo de cada tres días) con maquinaria (como un tractor).
- **Lixiviados:** Es importante tener un buen sistema para colectar los lixiviado. Estos se pueden usar para rehumedecer la celda, así conservar los nutrientes y bacterias en ella.
- **Techo:** Es muy recomendable usar un techo sobre celdas en climas tropicales debido a las lluvias fuertes que pueden inundar una celda.
- **Nutrientes:** Se necesita mantener las concentraciones de nutrientes inorgánicos en el rango de aprox. 100 ppm N, >10 ppm P, y >1 ppm K. El empleo de fertilizantes agrícolas comunes frecuentemente cumple con esta necesidad.
- **Temperatura:** La biorremediación funciona en un rango de temperatura de aprox. 5 a 40 °C, pero es mejor en una temperatura de aprox. 30° a 35°, idóneo para climas tropicales.
- **Bacterias nativas:** Es probablemente tan bien o mejor usar las bacterias nativas del sitio debido a que éstas ya están adaptadas a las condiciones particulares del sitio, y su desarrollo cuesta mucho menos que la compra de fórmulas comerciales de bacterias.
- **Acondicionadores:** Para mejorar el drenaje y mantenimiento de humedad en la celda se puede agregar otros materiales como arena, paja, cáscara de nuez, etc.
- **Humedad:** Es necesario mantener la humedad de una celda en un rango de aprox. 50 a 75 % de la capacidad de campo del material a tratar (ya con su acondicionamiento).<sup>(2)</sup>

## **1.6. Biopilas**

La Biopila es una técnica de remediación del tipo on side, para el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos. Su objetivo es estimular la actividad aeróbica de las moléculas bajo condiciones controladas.

Las biopilas se utilizan cuando la sustancia contaminante es demasiado volátil como para ser tratada con la técnica de landfarming, ya que las emisiones gaseosas serían demasiado altas, o cuando se quiere acelerar el proceso de biorremediación.

El tratamiento con Biopilas es una tecnología mediante el cual suelos contaminados excavados son mezclados con aditivos y dispuestos sobre áreas de tratamiento que incluyen impermeabilización, recogida de lixiviados y sistemas de aireación. Humedad, calor, nutrientes, oxígeno y pH pueden ser controlados para optimizar el proceso.

Los parámetros más importantes para evaluar la aplicabilidad de esta tecnología y su diseño son:

- Biodegradabilidad del Contaminante
- Temperaturas de la Zona de Aplicación
- Precipitaciones en la Zona
- Características del Suelo
- Espacio físico disponible
- Plazos requeridos.<sup>(9)</sup>

### **1.6.1. La técnica de Biopilas**

Consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado y materia orgánica (compost) en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes.

Estas pilas de compost pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación.

El sistema, que puede ser abierto o cerrado, se adiciona con nutrientes y agua y se coloca en áreas de tratamiento, que incluyen sistemas para colectar lixiviados y alguna forma de aireación.

La elección del tipo de sistema de biopilas depende principalmente de las condiciones climáticas y de la estructura de los compuestos orgánicos volátiles presentes en el suelo contaminado.

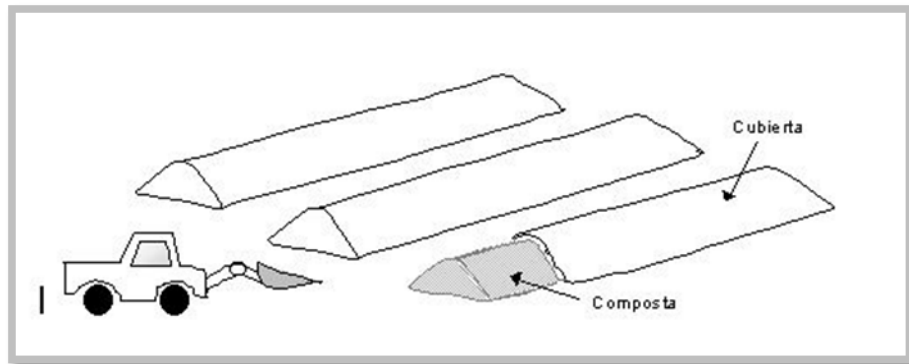
Generalmente las biopilas se diseñan como sistemas cerrados, ya que éstas permiten mantener la temperatura y evitan la saturación de agua debido a lluvias, además de disminuir la evaporación de agua y de compuestos orgánicos volátiles.<sup>(19)</sup>

Existen dos sistemas de biopilas: alargadas (más empleados) y las biopilas estáticas. La diferencia entre ambas tecnologías radica en el método de aireación que se emplea para proveer de oxígeno al proceso de composteo.

- a. **Biopilas alargadas.**- El sistema de biopilas alargadas es el proceso más económico y sencillo. En éstas, el material de compostaje se apila sobre una plataforma en montones alargados, la aireación se realiza mediante el mezclado manual o mecánico de la composta, proceso que a su vez permite homogeneizar la temperatura. El mezclado proporciona una mayor distribución y facilita la biodegradación de los contaminantes, ya que permite la homogeneización de los nutrientes, agua, aire, contaminantes y microorganismos.

La frecuencia del mezclado de la pila depende de la actividad microbiana, que generalmente puede determinarse por el perfil de la temperatura en la composta, que puede realizarse una vez al día o bien una vez al mes.

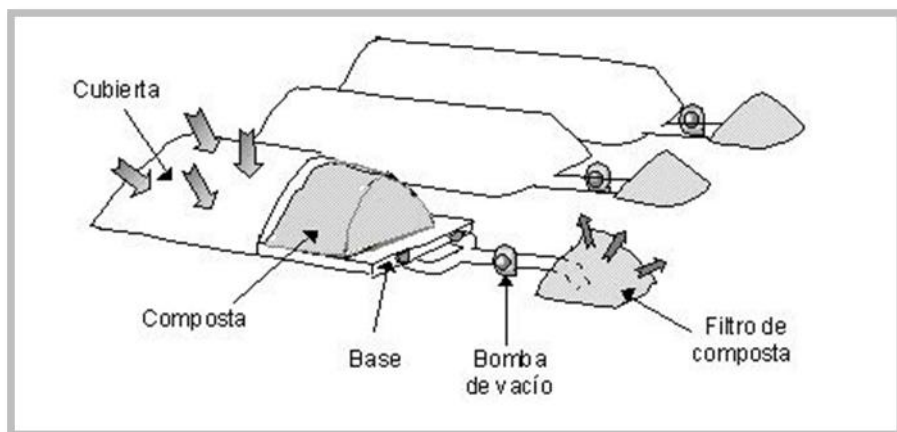
**Figura 1. Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas**



**Fuente:** Instituto Nacional de Ecología de Mexico., Sistema de composteo - biopilas alargadas

- b. **Biopilas estáticas.-** Las biopilas estáticas no necesitan mezclarse mecánicamente, ya que la aireación y homogeneización del calor en la composta se lleva a cabo por medio de un sistema de inyección (compresor) o extracción (vacío) de aire, mediante tubos colocados en la base alineados paralelamente a lo largo de la pila, normalmente se emplea un sistema de extracción de aire, ya que ello permite la captura de los vapores de cierta fracción de compuestos orgánicos volátiles que llegan a ser removidos del suelo contaminado durante el proceso de aireación. Estos vapores son enviados a un sistema de biofiltración u oxidación catalítica para su tratamiento.

**Figura 2. Representación esquemática de un sistema de biopilas estáticas**



**Fuente:** Instituto Nacional de Ecología de Mexico, Sistema de composteo - biopilas estáticas



El uso de un sistema de inyección o extracción de aire en este tipo de biopila, permite el control manual o automático de la velocidad del flujo de aire que provee de oxígeno al proceso de composteo, permitiendo así establecer una relación entre el flujo de aire y la actividad microbiana a través del tiempo.<sup>(10)</sup>

### **1.6.2. Principios básicos**

La construcción de una biopila de composteo (alargada o estática) consiste básicamente en realizar los siguientes pasos.

1. Acondicionamiento de un área que sirva de base para la biopila, cuya dimensión dependerá de la cantidad de suelo a tratar. La base puede ser un suelo arcilloso compactado, concreto o polietileno de alta densidad. Se recomienda la instalación de un sistema de recolección de lixiviados mediante canales o tubos.
2. Excavación del suelo contaminado. Se recomienda que antes de realizar esta actividad se lleve a cabo un estudio del sitio para conocer las características del suelo y del contaminante a tratar.
3. Transportación del suelo al sitio de tratamiento. Es recomendable que éste se encuentre lo más cercano posible al sitio en donde se localiza el suelo contaminado.
4. Acondicionamiento de la biopila. En esta fase, deben adicionarse los agentes de volumen, así como los nutrientes y agua necesarios. En algunos casos se recomienda la adición de microorganismos con capacidades metabólicas para degradar al (los) contaminante (s). Para el caso de suelos intemperizados, se recomienda la adición de surfactantes para facilitar la desorción de los contaminantes.
5. Instalación del sistema de aireación. En el caso particular de las biopilas estáticas es necesario que antes de formar la biopila, se instale el sistema de aireación sobre la base.
6. Mezclado del suelo y colocación del material sobre la base. No existe una medida idealmente establecida para el largo y ancho de las pilas, esto generalmente depende del volumen de suelo a tratar y del área disponible.

Finalmente la biopila debe cubrirse con un material inerte (grava, aserrín, polietileno de baja densidad, entre otros). En el caso de las biopilas estáticas, se requiere de la instalación de tubos de respiración.<sup>(11)</sup>

### 1.6.3. Factores a considerar

Las condiciones óptimas y el éxito de un proceso de composteo depende de diversos parámetros, los cuales pueden resumirse en tres categorías: las características del suelo, las condiciones climáticas y las características de los contaminantes. Los parámetros que deben considerarse y controlarse para aumentar la eficiencia de un proceso de composteo se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros a considerar y sus rangos óptimos durante un proceso de composteo para el tratamiento de suelos contaminados por compuestos orgánicos.

PARÁMETRO	RANGO ÓPTIMO
<b>Humedad</b>	40 -85%; 50 - 80% de la capacidad de campo
<b>pH</b>	6 - 8; con un óptimo de 7
<b>Relación de nutrientes (C:N:P:K)<sup>(a)</sup></b>	100:(3.3-10):(0.5-1):(0.1-1)
<b>Relación C/N; C/P; C/K<sup>(b)</sup></b>	10 - 30; 100 - 200; 100 - 1000
<b>Relación suelo: aditivos (peso seco)</b>	1.5:1 a 3:1
<b>Temperatura</b>	25 - 35 °C
<b>Contaminante(s)</b>	< 50,000 mg/kg
<b>Metales tóxicos</b>	< 2,500 mg/kg
<b>Cuenta bacteriana</b>	> 1,000 UFC <sup>(c)</sup> /g suelo seco

(a) C:N:P:K se refiere al contenido (en peso) de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), en relación con 100 partes (en peso) de carbono (C).

(b) C/N, C/P y C/K se refieren a las relaciones (en peso) de cada elemento relativo al carbono.

(c) UFC: unidades formadoras de colonias.

**Fuente:** Instituto Nacional de Ecología de Mexico., Factores a considerar en el diseño de una biopila

Un factor clave en el diseño de un proceso exitoso de composteo radica en la selección de su composición y contenido de aditivos o agentes de volumen, lo cual conlleva a un aumento en la velocidad de biodegradación de los contaminantes.

Sin embargo, si se emplea una gran cantidad de aditivos, el área necesaria para el tratamiento se incrementa. Una de las condiciones recomendadas para el empleo de este tipo de tecnología de biorremediación para suelos es el clima cálido, donde el rango de la temperatura oscile entre 20 y 40 °C, ello debido a que estos sistemas requieren temperaturas de operación entre 5 y 40°C.

La temperatura de operación de una biopila, normalmente debe encontrarse entre los 30 y 40 °C (etapa mesofílica) o entre 50 y 60 °C (etapa termofílica) y depende principalmente del calor generado por la actividad metabólica de los microorganismos en la composta y por las condiciones climáticas del lugar.<sup>(4)</sup>

#### Requerimientos y factores importantes para la biorremediación:

*Tipo de hidrocarburos:* Mejor con combustibles, lubricantes, petróleo crudo. Más difícil con aceite hidráulico, hidrocarburos muy viscosos, o hidrocarburos contaminados con otros compuestos (como metales, plaguicidas, etc.).

*Tipo de material:* Mejor con materiales de textura mediana, con alto contenido de materia orgánica. Más difícil con materiales muy arcillosos.

*pH:* Se puede manejar un pH de 4 a 6 sin mucho problema si se utilizan bacterias nativas. En la mayoría de suelos un pH de 6 a 8 es más adecuado.

*Salinidad:* Puede variar mucho. Si está en una zona de manglares debe de usar bacterias nativas, las cuales son adaptadas a las condiciones.

*Aireación:* Es importante mantener condiciones aerobias debido a que las tasas de biodegradación en condiciones anaerobias son aprox. 50 a 100 veces menores. Esto se logra utilizando un buen sistema de drenaje, y aireando el suelo frecuentemente (mínimo de cada tres días) con maquinaria (como un tractor).

*Lixiviados:* Es importante tener un buen sistema para coleccionar los lixiviados de una celda de “biopilas”. Estos se pueden usar para rehumedecer la celda, así conservando los nutrientes y bacterias en ella.

*Techo:* Es muy recomendable usar un techo sobre celdas de “biopilas” en climas tropicales debido a las lluvias fuertes que pueden inundar una celda.

*Nutrientes:* Se necesita mantener las concentraciones de nutrientes inorgánicos en el rango de aprox. 100 ppm N, >10 ppm P, y >1 ppm K. El empleo de fertilizantes agrícolas comunes frecuentemente cumple con esta necesidad.

*Temperatura:* La biorremediación funciona en un rango de temperatura de aproximadamente 5 a 40 °C, pero es mejor en una temperatura de aproximadamente 30 a 35 °C, idóneo para climas tropicales.

*Bacterias Nativas:* Es probablemente mejor usar las bacterias nativas del sitio debido a que éstas ya están adaptadas a las condiciones particulares del sitio, y su desarrollo cuesta mucho menos que la compra de fórmulas comerciales de bacterias.

*Acondicionadores:* Para mejorar el drenaje y mantenimiento de humedad en la celda se puede agregar otros materiales como arena, paja, cáscara de café, etc.

*Humedad:* Es necesario mantener la humedad de una celda de “biopilas” en el rango de aproximadamente 50 a 75 % de la capacidad de campo del material a tratar (ya con su acondicionamiento).

#### **1.6.4. Etapas del proceso**

De acuerdo con las características del proceso de composteo, en la etapa inicial es necesaria una aireación eficiente (alto flujo de aire), debido a que en esta etapa existe una acelerada actividad microbiana.

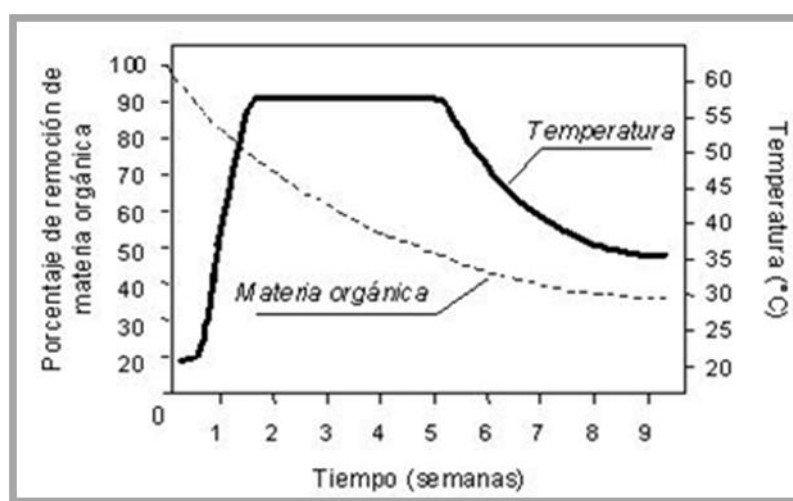
Este aumento en la actividad microbiana provoca un aumento en la demanda de oxígeno y un rápido aumento en la generación de calor metabólico, produciéndose temperaturas que se elevan hasta un rango termofílico (50 a 60 °C). Sin embargo, generalmente durante el composteo de suelos contaminados adicionados con agentes de volumen, el estado termofílico usualmente no se logra, por lo tanto, la temperatura no excede a los 45 °C.

Después de un cierto tiempo la actividad microbiana disminuye, debido a que los componentes fácilmente biodegradables son consumidos. En esta etapa el requerimiento de oxígeno y la temperatura disminuyen gradualmente, por lo que la composta requiere una menor aireación (menor flujo de aire).

En la Figura 3, se muestra la relación entre la degradación de compuestos orgánicos (función de la actividad microbiana) y los perfiles de temperatura dentro de la composta a través del tiempo.

De acuerdo con esta relación se puede emplear un programa analógico que regule automáticamente la velocidad de flujo del aire en función de la temperatura que se registra en la composta.

**Figura 3. Remoción de materia orgánica y perfiles de temperatura durante el proceso de composteo.**



**Fuente:** Instituto Nacional de Ecología de Mexico., Etapas del proceso del sistema de composteo.

El aumento y la caída en el perfil de la temperatura, a menudo pueden usarse para monitorear el desempeño de una pila de composteo. Una vez que la pila se enfría y la temperatura dentro de ésta se aproxima a la temperatura ambiente, el periodo de composteo activo puede considerarse completo.

Otras características que indican el éxito de un proceso de composteo, son el cambio en la textura y el olor de la pila en la etapa final. Al inicio del proceso se generan olores fuertes y desagradables, mientras que en la etapa final éstos desaparecen y el olor es parecido al de tierra de jardín. Por su parte, la textura de la mezcla es mucho más homogénea que al inicio.

Estos cambios en el olor y textura son el resultado de la biodegradación de la materia orgánica, que al pasar de forma sólida a gaseosa, da como resultado una reducción en el tamaño de la biopila. Dependiendo de la cantidad de material orgánico mezclado con el suelo, puede esperarse que la masa de la biopila se reduzca hasta en 40%.<sup>(1)</sup>

#### **1.6.5. Ventajas y desventajas de la biorremediación**

##### Ventajas

- Mientras que los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio a otro.
- Es una tecnología poco invasiva y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos que signifiquen una amenaza para el medio.
- Comparativamente, es económicamente viable y al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

##### Desventajas

- La biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida y algunos compuestos contaminantes son tan resistentes que pueden incluso inhibir a biorremediación.
- Es difícil predecir el tiempo de requerido para un proceso adecuado y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es dispendioso.

#### **1.6.6. Limitaciones de la biorremediación**

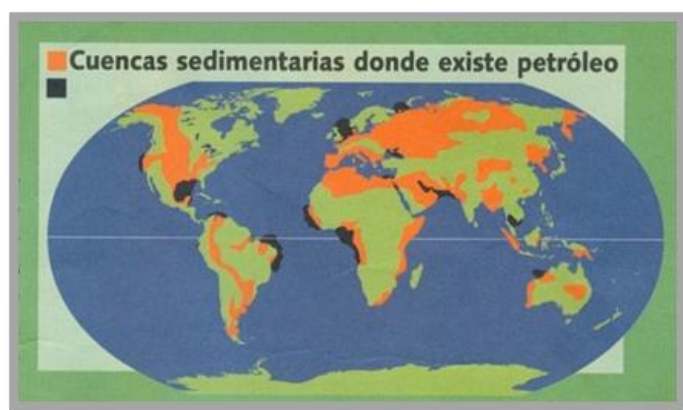
Es importante mencionar que la biorremediación tiene sus limitaciones y no se debe esperar una panacea. Aunque los hidrocarburos en el intervalo de gasolina y diesel (n-alcanos) se biodegradan fácilmente, es relativamente difícil la restauración de sitios altamente contaminados por hidrocarburos poli aromáticos (HPA<sub>S</sub>) a través de la biorremediación (Atlas, 1986). Esto se debe principalmente a la viscosidad alta y

solubilidad baja de los HPA<sub>s</sub>, las cuales limitan el área superficial disponible para el ataque de las enzimas bacterianas. Otros factores limitativos pueden ser las concentraciones tóxicas de los hidrocarburos de bajo peso molecular, y las concentraciones altas de metales (que no son biodegradables). A causa de esto se debe de considerar la biorremediación como una de las alternativas de tecnologías para el saneamiento de sitios contaminados por hidrocarburos. En una biorremediación se tiene que evaluar su efectividad en términos de costo-beneficio y compararla con otras tecnologías. De cualquier modo, usualmente se compensan estas limitaciones por el ahorro en los costos, en comparación con otras tecnologías de restauración. La biorremediación es típicamente 30 a 40 % del costo del tratamiento químico, la incineración o el relleno industrial (*King et al.*, 1992).

### 1.7. El Petróleo

El petróleo es un líquido natural, inflamable y de color generalmente negro, su olor es parecido al de la gasolina, kerosén o brea, está formado por una mezcla de hidrocarburos. El petróleo se encuentra en yacimientos subterráneos, en diferentes regiones, distribuidas por todo el planeta, conocidas con el nombre de cuencas sedimentarias. Las cuencas sedimentarias están formadas por capas o estratos dispuestos unos sobre otro, desde el más antiguo al más reciente, éstas pueden estar en tierra firme o en el mar entrampado al interior, en los poros de rocas fundidas.

**Figura 4. Cuencas sedimentarias donde existe petróleo**



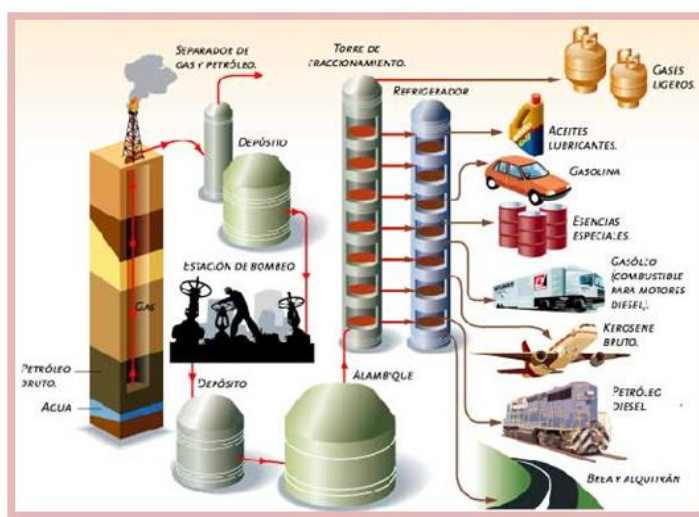
**Fuente:** <http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.

El petróleo no forma lagos subterráneos ni ríos interiores. La roca madre, inmersa en el mar, tenía sus poros llenos de agua. Al formarse el petróleo debido a la alta presión de generación, es expulsado hacia rocas porosas, donde desplaza el agua y pasa a ocupar los poros en la roca.

El petróleo es más liviano que el agua; literalmente flota y viaja sobre ella hasta un sitio donde es atrapado por lo que este no puede subir hacia la superficie, porque las rocas impermeables lo impiden.<sup>(17)</sup>

Es muy apreciado como fuente de energía, también es utilizado con fines industriales. El petróleo sirve de materia prima de equipos, telas, jabones, medicinas, pinturas, cosméticos, plásticos, entre otros.

**Figura 5. Derivados del petróleo**



**Fuente:** <http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.

Las operaciones petroleras que se realizan en la amazonia y en el resto del país son reguladas por las leyes y reglamentos que se buscan minimizar impactos que una actividad como la de buscar, producir y transportar petróleo, podría ocasionar al medio ambiente.<sup>(12)</sup>

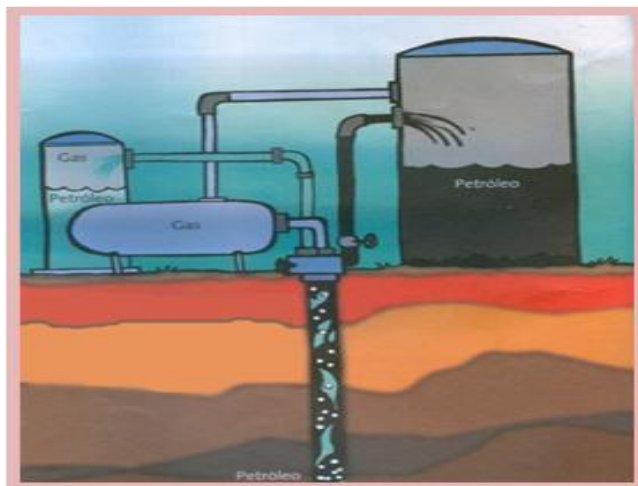


### 1.7.1. Sistemas de extracción de petróleo

La demanda de petróleo natural exige buscar yacimientos en zonas casi inaccesibles. Las plataformas petrolíferas extraen petróleo del mar. Las instalaciones terrestres son menos complejas, pero en ocasiones han de instalarse en lugares inhóspitos.

Aunque en un principio se empleó el método de percusión, cuando los pozos petrolíferos estaban situados a poca profundidad y bajo rocas de gran dureza, dicha técnica desde mediados del siglo XX dejó paso al método de rotación, ya que la mayor parte del petróleo se ha determinado que se encuentra a una profundidad de entre 900 y 5.000 metros, aunque hay pozos que llegan a los 7.000 u 8.000 metros.

**Figura 6. Extracción de petróleo**



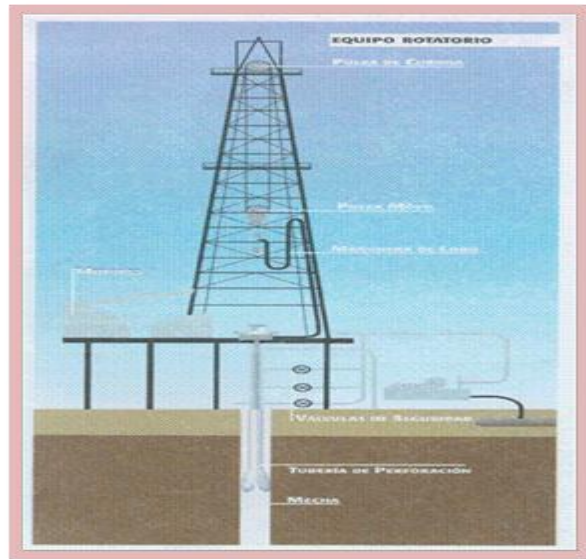
**Fuente:** <http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.

#### 1.7.1.1. Método de rotación

Consiste en un sistema de tubos acoplados unos a continuación de otros que, impulsados por un motor, van girando y perforando hacia abajo. En el extremo se halla una broca o trépano con dientes que rompen la roca, cuchillas que la separan y diamantes que la perforan, dependiendo del tipo de terreno.

Además, existe un sistema de polea móvil del que se suspende el conjunto de los tubos que impide que todo el peso de los tubos (los pozos tienen profundidades de miles de metros) recaiga sobre la broca.

**Figura 7. Equipo rotatorio**



**Fuente:** <http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.

#### **1.7.1.2. Encamisado**

Para evitar que las paredes del pozo se derrumben durante la perforación y, al mismo tiempo, la estructura de los estratos del subsuelo permanezca inalterada, según se va perforando el pozo, éste va siendo recubierto mediante unas paredes o camisas de acero de un grosor de entre 6 y 12 milímetros.

#### **1.7.1.3. Aprovechamiento del yacimiento**

Los cálculos realizados históricamente permiten afirmar que habitualmente una bolsa de petróleo sólo suele ser aprovechada entre un 25% y un 50% de su capacidad total. El petróleo suele estar acompañado en las bolsas por gas. Ambos, por la profundidad a la que se hallan, están sometidos a altas presiones, el gas por esa circunstancia, se mantiene en estado líquido.

Al llegar la broca de perforación, la rotura de la roca impermeable provoca que la presión baje, por lo que, por un lado, el gas deja de estar disuelto y se expande y el petróleo deja de tener el obstáculo de la roca impermeable y suele ser empujado por el agua salada que impregna generalmente la roca porosa que se encuentra por debajo de la bolsa de petróleo. Estas dos circunstancias hacen que el petróleo suba a la superficie.

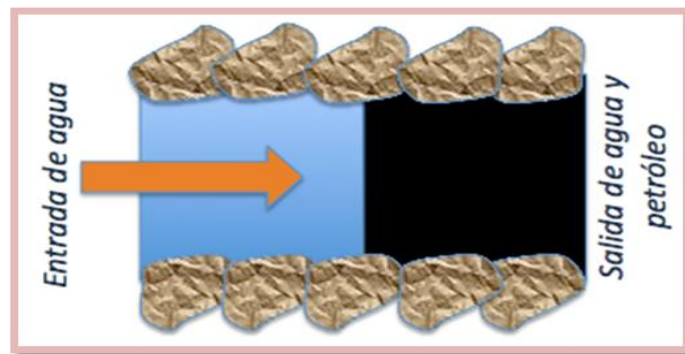
#### **1.7.1.4. Bombeo del petróleo**

Llega un momento en que la presión interna de la bolsa disminuye hasta un punto en que el petróleo deja de ascender solo y, por otro lado, el gas, cada vez menor, deja de presionar sobre el crudo, por lo que hay que forzarlo mediante bombas para que suba. Este bombeo se realiza hasta el momento en que el coste del sistema de extracción es mayor que la rentabilidad que se obtiene del petróleo, por lo que el pozo es abandonado.

#### **1.7.1.5. Inyección de agua**

Para aumentar la rentabilidad de un yacimiento se suele utilizar un sistema de inyección de agua mediante pozos paralelos. Mientras quede un pozo se extrae petróleo, en otro realizado cerca del anterior se inyecta agua en la bolsa, lo que provoca que la presión no baje y el petróleo siga siendo empujado a la superficie, y de una manera más rentable que las bombas. Este sistema permite aumentar la posibilidad de explotación de un pozo hasta, aproximadamente, un 33% de su capacidad.

**Figura 8. Desplazamiento del petróleo por agua**



**Fuente:** <http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.

#### **1.7.1.6. Inyección de vapor**

En yacimientos con petróleo muy viscoso (con textura de cera) se utiliza la inyección de vapor, en lugar de agua, lo que permite conseguir dos efectos:

- a. Por un lado, se aumenta, igual que con el agua, la presión de la bolsa de crudo para que siga ascendiendo libremente.
- b. Por otro, el vapor reduce la viscosidad del crudo, con lo se hace más sencilla su extracción, ya que fluye más deprisa.

#### **1.7.1.7. Extracción en el mar**

El avance en las técnicas de perforación ha permitido que se puedan desarrollar pozos desde plataformas situadas en el mar (off-shore), en aguas de una profundidad de varios cientos de metros.

En ellos, para facilitar la extracción de la roca perforada se hace circular constantemente lodo a través del tubo de perforación y un sistema de toberas en la propia broca.

Con ello, se han conseguido perforar pozos de 6.400 metros de profundidad desde el nivel del mar, lo que ha permitido acceder a una parte importante de las reservas mundiales de petróleo.<sup>(16)</sup>

### 1.7.2. Tipos de petróleo

El petróleo crudo se mide, por su calidad, en grados API, siglas que corresponden a "American Petroleum Institute". El petróleo que tiene más grados API, lleva el nombre de "liviano" y es más costoso; el que tiene menos grados API, se llama "pesado".

Según el contenido de azufre, el petróleo puede ser agrio y dulce. En el campo comercial valen más los petróleos que tienen menos azufre (conocidos como petróleos dulces 0.2 a 0.8. de a .8 a 1.5 medio y de 1.5 es agrio).

#### 1.7.2.1. Clasificación del petróleo según su gravedad api

- Crudo liviano o ligero: tiene gravedades API mayores a 31,1 °API
- Crudo medio o mediano: tiene gravedades API entre 22,3 y 31,1 °API.
- Crudo pesado: tiene gravedades API entre 10 y 22,3 °API.
- Crudo extra pesado: gravedades API menores a 10 °API.
  
- **Livianos**  
Muy fluidos, parecidos al kerosén. Son de tonos claros, con bajo contenido de azufre y metales. Generalmente poseen un alto contenido de gas disuelto, lo que permite su extracción inicial por flujo natural.
  
- **Medianos**  
Con características intermedias de los dos anteriores. Para su extracción se utilizan directamente en la mayoría de los casos, las técnicas de inyección de gas.
  
- **Pesados y extra pesados**  
Son poco fluidos, tanto o más que la miel, son muy espesos, de intensos tonos negros, con bajo contenido de gas disuelto; lo que hace difícil su extracción y manejo. No llegan hasta la superficie por sí solos. Para su extracción es necesaria la utilización directa de técnicas de inyección de gas y vapor de agua, además de técnicas más complejas.<sup>(20)</sup>

### **1.7.2.2. El petróleo en el Ecuador**

EP PETROECUADOR (Empresa Estatal de Petróleos del Ecuador) es una empresa estatal ecuatoriana, creada el 26 de septiembre de 1989, encarga de la explotación de hidrocarburos. El Estado, directamente por medio de EP PETROECUADOR o por contratos de asociación con terceros, asume la exploración y explotación de los yacimientos de hidrocarburos en el territorio nacional y mar territorial.

El petróleo que se produce en los diversos campos operados por la estatal EP PETROECUADOR o las empresas privadas, es enviado por tubería a los tanques de almacenamiento que se ubican en Lago Agrio y de allí, se lo transporta por el Oleoducto Transecuatoriano y el Oleoducto de Crudos Pesados (OCP), hasta Balao para su exportación, o a las Refinerías de Esmeraldas y La Libertad para ser procesado como combustibles.

En la actualidad, EP PETROECUADOR opera un 72 % de los yacimientos ubicados en la Amazonía. Un grupo de empresas extranjeras privadas se encarga de operar el resto de yacimientos.

El crudo de exportación de la Amazonía ecuatoriana tiene un promedio de 24.8°API. En la Península de Santa Elena existen crudos de hasta 42°API. Al este y oeste de la región amazónica, en cambio, hay una buena reserva de crudos pesados (entre 15 Y 20°API).<sup>(20)</sup>

### **1.8. Puntos críticos donde se puede producir los derrames**

Las empresas responsables del proceso extractivo de energéticos jamás han respetado a la naturaleza de la zona de explotación, éstas deberían parar la contaminación e incrementar la eficiencia de sus operaciones en los campos petroleros existentes mediante la utilización de una tecnología más adecuada.

El Estado debe ser el principal garante del derecho a vivir en un ambiente libre de contaminación. Toda iniciativa en beneficio del desarrollo de una cultura ecológica siempre será plausible. Los impactos se dan en todas las fases del proceso como son

exploración, perforación, producción, almacenamiento, transporte, procesamiento y distribución de derivados.

Las principales causas de los derrames son el mal mantenimiento y descuido en las operaciones, goteras en los tanques de almacenamiento, las válvulas, pozos y líneas de flujo; debido a válvulas mal cerradas o por inadecuados trabajos de soldadura.

Estos se pueden generar por:

- La inevitabilidad de generarlos, dado que son inherentes a la actividad petrolera;
- Contingencia o causas de fuerza mayor;
- Factores humanos: impericia, negligencia, etc.

#### **1.8.1. Derrames petroleros registrados en el Ecuador**

Considerables volúmenes de petróleo se han derramado, tanto del oleoducto principal como de ductos secundarios, provocando serios daños sobre todo en cuerpos de agua. Se estima que solamente del SOTE (Sistema de Oleoducto Transecuatoriano) se han derramado unos 16,5 millones de galones de petróleo.

La contaminación es extremadamente grande desde 1972 hasta 1989 se habían vertido 19 mil millones de galones de desechos tóxicos al ambiente, lo que corresponde a un promedio diario de 4.368 millones.

El crudo que es vertido con el agua diariamente es de 2.100 a 2.400 galones. Además se vierte 4 millones de barriles de lodo de perforación y 40 mil barriles de otros químicos altamente tóxicos, sin tratamiento previo.

El contenido de las aguas salobres tóxicas de yacimientos petroleros es rico en sulfatos, bicarbonatos, sulfuro de hidrógeno, cianuro, dióxido de carbono, metales pesados y otras sustancias químicas radioactivas incluyendo Uranio y Torio, esto, representa niveles de radioactividad más altos que las emisiones permitidas por una planta nuclear.

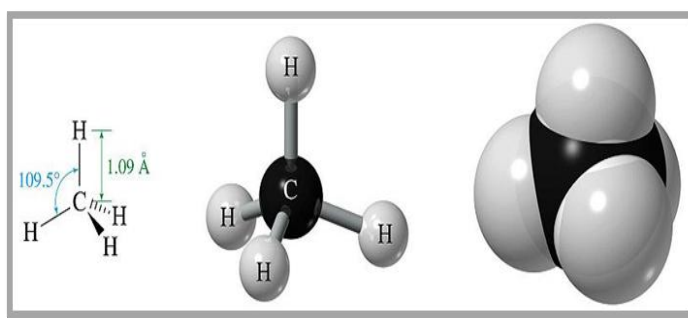
Se cree que los derrames aumentarán, pues el SOTE y los oleoductos secundarios siguen envejeciendo y no existe un efectivo mantenimiento. El riesgo persiste sobre

todo en las zonas de la concesión Texaco–Petroecuador, donde el diseño de vida útil era de 20 años (1972-1992).<sup>(17)</sup>

### 1.9. Hidrocarburos

Es un grupo de compuestos orgánicos constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno. La conformación y estructura de sus moléculas abarca desde la más simple, el metano ( $\text{CH}_4$ ), hasta aquellas de elevada complejidad como los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

**Figura 9. Representaciones del metano**



**Fuente:**[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/Representaciones\\_del\\_metano.JPG](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/Representaciones_del_metano.JPG)

Dentro de ellos existen familias de compuestos agrupadas según su estructura molecular y propiedades. Los átomos de carbono se unen entre sí formando el esqueleto básico, pudiendo hacerlo en estructuras lineales simples, ramificadas o en estructuras cíclicas en forma de anillos.<sup>(15)</sup>

Las fuentes principales de los hidrocarburos son el petróleo, el gas natural y el carbón. A partir de comienzos de este siglo, con el desarrollo de la extracción de petróleo y el afianzamiento de la tecnología química, surge la Petroquímica, industria que con la producción de hidrocarburos, constituye uno de los pilares de la tecnología actual.

Actualmente los modelos de producción de bienes y servicios están directa o indirectamente basados en la industria petroquímica.<sup>(18)</sup>

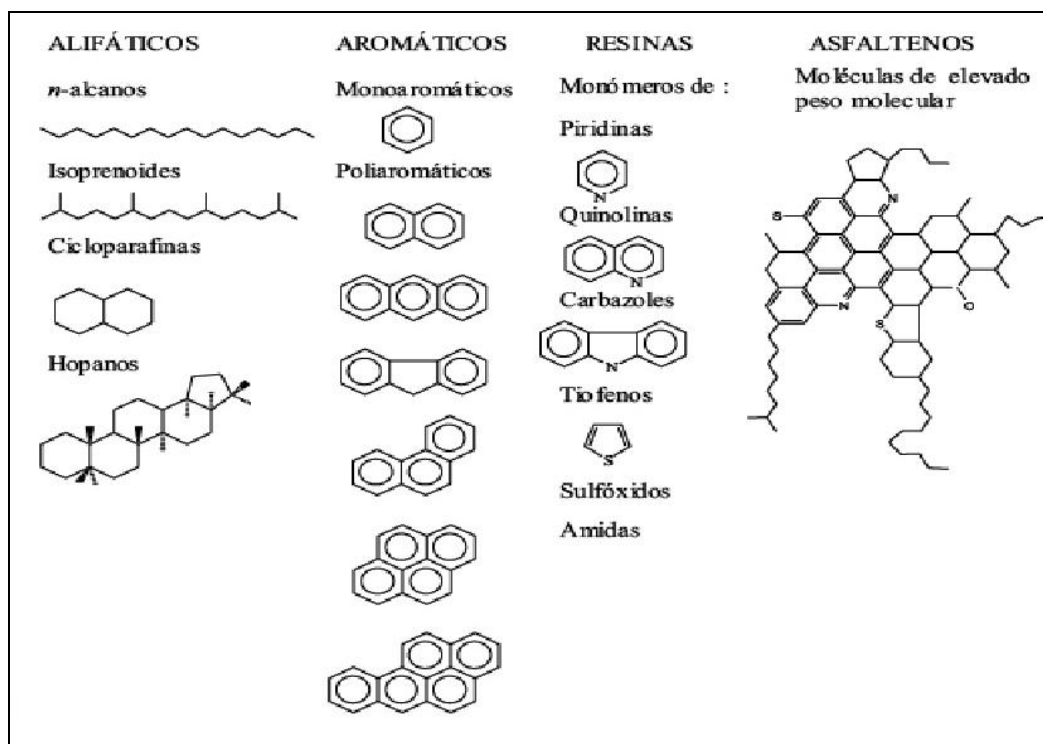


La energía que hoy se emplea mundialmente proviene, en su mayor parte (>70%), de la combustión de hidrocarburos; los medios de transporte (terrestres, aéreos y marítimos) los emplean como combustibles, y gran parte de la variedad de productos plásticos se sintetizan a partir de ellos.

La extrema dependencia alcanzada hacia los hidrocarburos por el mundo actual, y su elevado consumo, han traído problemas ambientales expresados en términos de contaminación atmosférica por sus productos de combustión, contaminación de aguas, derrames de petróleo, producción y acumulación de residuos no biodegradables (plásticos).

Por otra parte, siendo el petróleo, el gas natural y el carbón, un recurso natural no renovable, su consumo debería racionalizarse y muchas de sus aplicaciones sobre todo la energética, sustituirse paulatinamente por fuentes ambientalmente más limpias y duraderas.<sup>(3)</sup>

**Figura 10. Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo**



**Fuente:** <http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.

### **1.9.1. Biodegradación del petróleo**

El petróleo es una mezcla compleja no homogénea de hidrocarburos insolubles en agua. Estos hidrocarburos son principalmente alcanos o parafinas, ciclo alcanos o naftalenos, alquenos, alquinos y algunos hidrocarburos aromáticos.

Todos estos hidrocarburos se degradan, generalmente mediante oxidación, con diversos fines entre los que se encuentra proporcionar los nutrientes que necesitan algunos seres vivos, como son el  $\text{CO}_2$  o el  $\text{H}_2\text{O}$ .

Esta degradación de los hidrocarburos que componen el petróleo la llevan a cabo fundamentalmente microorganismos, aunque también la pueden realizar otros seres vivos como dos especies de camarones que son *PeanusDuorarum* y *PeanusAztecuz*.

La degradación de los hidrocarburos que realizan los microorganismos recibe el nombre de biodegradación. La biodegradación es un proceso natural por medio del cual las sustancias son descompuestas en otras más simples en el medio ambiente. Los principales agentes biodegradantes son las bacterias, los hongos y las algas, aunque las bacterias son las más activas.

Este proceso puede ocurrir en el suelo, en el agua o en la tierra vegetal. La biodegradación también puede ser usada para limpiar el agua que se encuentra a miles de metros bajo la superficie terrestre. La actividad biológica es fundamental a la hora de explicar el comportamiento del suelo en los procesos de biorremediación y en especial de la materia orgánica. Del conjunto de procesos biológicos que se desarrollan en el suelo, cabe resaltar la actividad microbiana, como la enzimática. Dada la imposibilidad de identificar a todos y cada uno de los microorganismos que se encuentran en el suelo contaminado se recurre con frecuencia a un estudio de su actividad global. Un ejemplo lo constituye la actividad respiratoria a través de la medida de producción de  $\text{CO}_2$ .

Las propiedades biológicas y bioquímicas son muy sensibles a las perturbaciones ambientales a los cambios de manejo del suelo en la biorremediación, respondiendo rápidamente a dichos cambios. La adición de nutrientes en el suelo altera la actividad

biológica mejorando la biodegradación de contaminantes. El estudio de distintas actividades enzimáticas resulta muy útil en el diagnóstico y cuantificación de la recuperación de un suelo contaminado. Así se ha generalizado el estudio de la actividad enzimática para evaluar la eficiencia del proceso de biorremediación. La actividad hidrocarburífera ha producido y produce alteraciones en el suelo por la ocurrencia de derrames de petróleo y derivados, tanto en forma accidental como por malas prácticas operativas desarrolladas antiguamente. Como consecuencia de ello, se afectan las propiedades físicas y fisicoquímicas del suelo produciéndose la degradación del mismo.

Las políticas ambientales actuales establecen un uso apropiado de los recursos naturales y marcan la tendencia a la protección y recuperación de los ambientes degradados como resultado de la intervención antrópica; con el fin de lograr la sustentabilidad de aquellas actividades económicas donde el ambiente se vea comprometido.

La descomposición microbiana del petróleo y de sus derivados es de considerable importancia económica y ambiental. El petróleo es una rica fuente de materia orgánica y los hidrocarburos que contiene son rápidamente atacables por diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas. No resulta extraño, por tanto, que en contacto con aire y la humedad sea atacado por los microorganismos. En determinadas circunstancias, como el almacenado en grandes tanques, el crecimiento microbiano no es deseable. Sin embargo, en otras situaciones, como cuando se produce algún vertido de petróleo su utilización por los microorganismos es deseable, e incluso, puede ser estimulada añadiéndoles nutrientes orgánicos. La descomposición del petróleo es similar a la descomposición enzimática de algunos productos naturales como lignina, celulosa y diferentes lípidos. En este hecho se basa la importancia para la eliminación de petróleo y de otros contaminantes. En la bioquímica de la degradación del petróleo se destaca la importancia de la función que desempeñan las enzimas en la introducción de átomos de oxígeno en el hidrocarburo, lo que permite que haya posteriores procesos bioquímicos. Se ha demostrado que una gran variedad de bacterias (incluyendo algunas cianobacterias), diversos mohos y levaduras, así como determinadas algas verdes pueden oxidar hidrocarburos aeróbicamente. Es muy frecuente la contaminación a pequeña escala por petróleo en

ecosistemas acuáticos y terrestres debido tanto a actividades humanas como a causas naturales. Existen diversas comunidades microbianas capaces de utilizar hidrocarburos como donadores de electrones. El metano, el hidrocarburo más sencillo, es degradado por un grupo especializado de bacterias, las bacterias metanotróficas; pero estos microorganismos no pueden crecer con hidrocarburos de mayor número de carbonos; de la eliminación de vertidos de petróleo, los microorganismos actúan oxidando el petróleo a CO<sub>2</sub>. Cuando se producen grandes vertidos las fracciones de hidrocarburos volátiles se evaporan rápidamente, quedando los componentes aromáticos y alifáticos de cadena larga para que sean eliminados por los organismos. De la gran cantidad de microorganismos capaces de degradar el petróleo destacan las bacterias y los hongos. Dentro de las bacterias hay gran cantidad de géneros capaces de descomponer u oxidar los hidrocarburos que forman el petróleo como por ejemplo los géneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beneckea*, *Brevibacterium*, *Coryneformes*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leumthrix*, *Moraxella*, *Nocardia*, *Peptococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Spherotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Xanthomyces*.

De todos estos géneros los siguientes son los que tienen mayor importancia en la biodegradación del petróleo:

- Pseudomonas

Es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasas positivas, catalasas positivas y aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, como son los hidrocarburos que forman el petróleo, especialmente cepas de las especies *Pseudomonasputida* o *Pseudomonasaeruginosa*. El amplio potencial catabólico de los componentes del género viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones auto transmisibles. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no encuentra parangón en las bacterias de otros géneros. Las cepas de la especie

*Pseudomonas* Putida sólo pueden degradar los hidrocarburos aromáticos que forman el petróleo. Las cepas de la especie *Pseudomonasaeruginosa* es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga.

- Flavobacterium

Es un género bacteriano perteneciente al grupo de las flavobacterias organotrófas, es decir que se alimentan de todo de tipo de compuestos orgánicos entre los que se encuentran los hidrocarburos. Este género se alimenta principalmente de alcanos y alquenos. Se trata de bacilos aerobios, inmóviles y Gram negativos.

- Nocardi

Es un género de bacterias Gram-positivas que se encuentran en suelos de todo el mundo ricos en materia orgánica. Son capaces de degradar hidrocarburos cuya cadena no es muy larga en condiciones aeróbicas. Son catalasa-positivas y con forma de coco.

- Bacillus

Es un género de bacterias en forma de bastón y Gram positiva. El género *Bacillus* pertenece a la División Firmicutes. Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endoespora de situación central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. La mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa y son saprofitas. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, aparte de alimentos que contaminan con su presencia. La especie del género *Bacillus* que puede degradar hidrocarburos para obtener nutrientes se denomina *Bacilluscirculans*.

Dentro de los hongos también hay muchos géneros que son capaces de degradar petróleo para obtener nutrientes (Allescheria, Aspergillus, Botrytis, Candida, Cephalosporium, Cladosporium, Cunninghamella, Debaromyces, Fusarium, Gonytrichum, Hansenula, Helmintrosporium, Mucor, Oidiodendrum, Paecylomyces, Phialophora, Penicillium, Rhodosporidium, Rhodotorula, Saccharomyces, Saccharomycopsis, Scopulariopsis, Sporobolomyces, Torulopsis, Trichoderma, Trichosporon, etcétera.) pero los más importantes son :

- Aspergillus

El Aspergillus es un género de alrededor de 200 hongos (mohos) es ubicuo, es decir, que puede vivir en todos los lugares. El Aspergillus es un hongo filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas), el tipo de hongos opuesto a las levaduras, éstas últimas compuestas de una sola célula redondeada. El hábitat natural del Aspergillus son el heno y el compostaje. Aunque al ser microorganismos oportunistas y ubicuos pueden vivir en otros medios como en zonas donde hay petróleo y utilizar los hidrocarburos que lo componen como fuentes de carbono, es decir, como nutrientes.

- Saccharomyces

El género Saccharomyces incluye muchos tipos diferentes de levaduras y forma parte del reino de los hongos. La incapacidad para utilizar nitratos y la capacidad de fermentar varios carbohidratos son las características típicas de los Saccharomyces. Para poder realizar esas fermentaciones necesita carbono que obtiene entre otros métodos mediante la degradación de hidrocarburos que forman parte del petróleo y de sus derivados.

- Penicillium

Es un género del reino Fungí, es decir, el reino de los hongos. Tiene entre 100 y 150 especies, entre las que se encuentran algunas que poseen las enzimas necesarias para poder obtener carbono mediante la degradación de los hidrocarburos del petróleo.

Aunque todos los géneros de hongos y bacterias citados con anterioridad son capaces de degradar el petróleo porque posee las enzimas necesarias para ello, las que tienen mayor importancia son las bacterias, especialmente las cepas de la especie *Pseudomonas*.

El desarrollo y aplicación de tecnologías para la restauración de ambientes degradados en el nivel internacional ha sido considerable, sin embargo en nuestro país el avance científico en la temática ambiental se encuentra en una etapa inicial. Una estrategia adecuada para minimizar la contaminación es la disminución de la reactividad y peligrosidad del contaminante. Existen diversas técnicas destinadas a la rehabilitación de ambientes comprometidos, denominadas en su conjunto Técnicas de Remediación. Mediante el uso y aplicación de estas tecnologías es posible la restauración ó recuperación, es decir el retorno a las condiciones previas a la contaminación ó, al menos similar, de suelos y cuerpos de agua subterráneos y superficiales, para su posterior reutilización y aprovechamiento. Es por ello que la investigación para la optimización de métodos de remediación y su adaptación a las condiciones locales, es de extrema importancia y constituye un aporte al progreso del conocimiento y la investigación en el ámbito nacional y regional.

### **1.9.2. Descontaminación del suelo**

La bioreparación (“bioremediation”) es una tecnología de tratamiento de la contaminación que utiliza los sistemas biológicos para mineralizar o transformar los contaminantes y es un concepto que ha entrado por derecho propio en los textos científicos. La bioestimulación (adición de nutrientes y la aireación), el bioaumento (adición de microorganismos) y el registro de la biodegradación natural (bioreparación intrínseca) son los tres procesos incluidos en el concepto de bioreparación del suelo.

#### Degradación microbiana

La biodegradación es el resultado de la metabolización. El suelo tiene una capacidad intrínseca de bioreparación en la que participan los microorganismos. En suelos con

malas condiciones para el desarrollo microbiano, la bioreparación intrínseca decrece. Es posible encontrar mezclas de hidrocarburos prácticamente inalteradas tras 25 años de la contaminación de suelos con malas condiciones para el desarrollo microbiano (muy contaminados, con escasos nutrientes y bajas temperaturas). La conclusión es que los microorganismos participan de la bioreparación intrínseca de los suelos

### **1.9.3. Impactos ambientales provocados por el petróleo**



**Tabla 3.** Cuadro resumen impactos ambientales

CONTAMINANTE	TIPO	IMPACTOS
Compuestos Orgánicos Volátiles (COV <sub>s</sub> )	Benceno Tolueno Xileno	Son disolventes de las grasas y por esto actúa sobre la piel produciendo dermatitis. En el sistema nervioso produce excitación, depresión, dolores de cabeza y hormigueos en manos y pies. Su efecto más importante es sobre la médula produciendo anemia, pérdida de defensas y pudiendo causar leucemia que produce la muerte, en el 50% de los casos con tratamiento. Pueden producir malformaciones congénitas.
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP <sub>s</sub> )	Antraceno PirenoFenantreno Benzopireno	Son fuertemente irritantes de la piel. Pueden producir enrojecimientos y lesiones, cáncer de piel, de testículos y de pulmones.
Gases de azufre (SO <sub>2</sub> )		La intoxicación aguda afecta al sistema nervioso causando dolores de cabeza, mareos, desmayos, paro respiratorio, asfixia por espasmo y muerte. Pueden producir rinitis, laringitis, bronquitis, neumonías. En ambientes húmedos generan partículas de ácido sulfúrico que será muy irritante de piel, ojos y aparato respiratorio. La intoxicación crónica puede dar faringitis y bronquitis crónicas por irritación directa. Su presencia aumenta en un 20% la muerte de enfermos de pulmón y corazón. Es cancerígeno, especialmente de pulmón. El cáncer de laringe está relacionado con estos gases.
Metales pesados	Cadmio Cromo Plomo Mercurio Cobalto Cobre	Todos estos metales producen alto riesgo a la salud humana y tienen la capacidad de bio acumularse en seres vivos y entrar a formar parte de las cadenas de alimentos. Producen irritaciones de la piel, problemas reproductivos y cáncer.
Elementos radioactivos		Producen irritaciones de la piel, problemas reproductivos y cáncer.
Monóxido de carbono (CO)		Lesiones de corazón, músculos y cerebrales. Puede ser mortal en espacios cerrados.
Óxidos de Nitrógeno (NO <sub>2</sub> )		Al unirse con el agua forma ácido nítrico que con los hidrocarburos no quemados aumentan el efecto invernadero, la lluvia ácida y causa problemas respiratorios. Con la luz solar puede facilitar la producción de ozono, que es un gas que irrita el sistema respiratorio.
Óxidos de azufre (SO <sub>2</sub> )		Esta sustancia es la responsable de la acidificación de los suelos, de las aguas superficiales y de la generación de enfermedades en la población, pues al unirse con el agua forma partículas en suspensión de ácido sulfúrico que penetra en pulmones, ojos y piel irritándolos seriamente. El radio de acción de este tipo de emisiones llega a 5 Km a la redonda.
Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> )		Aumentará su presencia en la atmósfera y contribuye al efecto invernadero.

**Fuente:** <http://www.scribd.com/doc/2883973/Impactos-ambientales-del-petróleo>

### 1.10. Reglamento al cual se va a regir el proyecto

Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburíferas, Decreto Ejecutivo 1215, Registro Oficial 265 de 13 de Febrero del 2001. Capítulo XII, referente a los límites permisibles, Tabla N°. 6: Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios. Los límites permisibles a aplicarse en un proyecto determinado dependen del uso posterior a darse al suelo remediado, el cual constará en el respectivo Programa o Proyecto de remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental.

De presentar los suelos naturales (No Contaminados) del área concentraciones superiores a los límites establecidos, se pueden incrementar los valores del respectivo parámetro hasta este nivel, siempre que se haya comprobado este fenómeno estadísticamente a través de un monitoreo de suelos no perturbados ni influenciados en la misma área. El monitoreo consistirá de una caracterización inicial del sitio y/o material a remediarse, un monitoreo de por lo menos un muestreo con los respectivos análisis cada seis meses, y una caracterización final una vez concluidos los trabajos. Dependiendo la tecnología de remediación aplicada, la frecuencia del monitoreo será mayor, conforme al Programa o Proyecto de remediación aprobado por la Subsecretaría de Protección Ambiental.

**Tabla 4.** Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en todas las fases de la industria hidrocarburífera, incluidas las estaciones de servicios. <sup>(7)</sup>

Parámetro	Expresado en	Unidad	Uso agrícola	Uso industrial	Ecosistemas sensibles (*)
Hidrocarburos totales	TPH	mg/kg	< 2500	< 4000	< 1000
Hidrocarburos aromáticos polícíclicos (HAP's)	C	mg/kg	< 2	< 5	< 1
Cadmio	Cd	mg/kg	< 2	< 10	< 1
Níquel	Ni	mg/kg	< 50	< 100	< 40
Plomo	Pb	mg/kg	< 100	< 500	< 80

\*Valores límites permisibles para la protección de ecosistemas sensibles tales como Patrimonio Nacional de Áreas Naturales y otros identificados en el correspondiente estudio ambiental.

**Fuente:** Reglamento Ambiental de Actividades Hidrocarburífera, Decreto Ejecutivo 1215

### 1.11. El Carbono

El carbono, vital para todos los seres vivos, circula de manera continua en el ecosistema terrestre. En la atmósfera existe en forma de dióxido de carbono, que emplean las plantas en la fotosíntesis. Los animales usan el carbono de las plantas y liberan dióxido de carbono, producto del metabolismo. Aunque parte del carbono desaparece de forma temporal del ciclo en forma de carbón, petróleo, combustibles fósiles, gas y depósitos calizos, la respiración y la fotosíntesis mantienen prácticamente estable la cantidad de carbono atmosférico. La industrialización aporta dióxido de carbono adicional al medio ambiente. El suelo desempeña un importante papel en el ciclo del C y puede representar una fuente importante de CO<sub>2</sub> y de otros gases a la atmósfera. La cantidad total de C que contiene el suelo es dos a tres veces superior al del CO<sub>2</sub> atmosférico (Bouwman, 1990).

En el suelo, este gas se produce, fundamentalmente, a través del metabolismo de la micro flora y de las raíces de las plantas, siendo la descomposición microbiana de compuestos orgánicos el proceso más importante que lo genera.

Durante la descomposición una parte del carbono es devuelto a la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub>, mientras que otra se transforma en otros compuestos más sencillos o se almacena en las propias estructuras microbianas. Los flujos de CO<sub>2</sub> entre la atmósfera y el suelo cumplen una función clave en el funcionamiento del ciclo global del C, por lo que la perturbación de los procesos que los regulan puede modificar la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico. De hecho, entre las actividades que aumentan la emisión de este gas a la atmósfera destacan los cambios de uso del suelo y su sobre explotación, y entre ellas, la deforestación y las labores selvícolas. El manejo forestal intensivo altera considerablemente las propiedades y condiciones ambientales del suelo (Munson *et al.*, 1993; Merino *et al.*, 1997a), lo que puede repercutir en la actividad de los micro organismos (Bauhus & Bartel, 1995) y, por consiguiente, en la descomposición de la materia orgánica (Cortina & Vallejo, 1994) y en la dinámica de CO<sub>2</sub> del suelo (Mattson & Swank, 1989; Brumme, 1995). Las diferentes respuestas parecen estar relacionadas con la modificación de las condiciones ambientales del suelo ocasionadas después de la retirada de la cubierta arbórea y que están determinadas en parte por los diferentes tratamientos que pueden recibir las grandes

cantidades de residuos generados durante la corta. Por otro lado, debido a las importantes funciones que desempeña la materia orgánica, la modificación de la dinámica del C por las labores forestales, también pueden deteriorar la fertilidad y conservación de los suelos. Se ha observado cómo técnicas de preparación del terreno ocasionan reducciones importantes del contenido de materia orgánica del suelo, atribuibles tanto a la retirada de los residuos de corta como a un aumento de la tasa de mineralización.

### EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub>

Otro parámetro relacionado a evaluar la degradación efectiva por parte de los microorganismos, es la producción de CO<sub>2</sub>, el cual se genera como subproducto de la oxidación de los Hidrocarburos (Gernaey *et al.*, 2001; Critter *et al.*, 2004). La medición de la producción de CO<sub>2</sub> es considerada como uno de los parámetros más efectivos y confiables para evaluar la actividad microbiana. Por otro lado existen otras técnicas para cuantificar el CO<sub>2</sub>, como la titulación ácido base, donde un agente alcalino como el hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de bario (Ba(OH)<sub>2</sub>) o hidróxido de litio LiOH retienen el CO<sub>2</sub> formado con la actividad microbiana y es cuantificado por titulación con ácido clorhídrico y fenolftaleína como indicador (Margesinet *et al.*, 2000; Kijchavengkulet *et al.*, 2006). La cromatografía, es un método fisicoquímico de separación, donde la muestra se desplaza por una fase móvil que puede ser gaseosa o líquida o fluido súper crítico, encargada de mover la muestra a través de la columna. Esta fase móvil pasa a través de una fase estacionaria la cual es inmisible, y se queda fija a una columna o a una superficie sólida (Skoog *et al.*, 2001).

### DETERMINACIÓN POR ABSORCIÓN INFRARROJA DE CO<sub>2</sub>

La radiación infrarroja es absorbida por gases tales como el CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> o NO, con una longitud de onda típica de cada componente (rango de longitud de onda de unas pocas  $\mu\text{m}$ ). La atenuación de un determinado rango de radiación infrarroja a medida que un volumen de gas pasa a su través es, por consiguiente, una medida de las concentraciones del componente gaseoso en el gas a medir que ha pasado a su través.

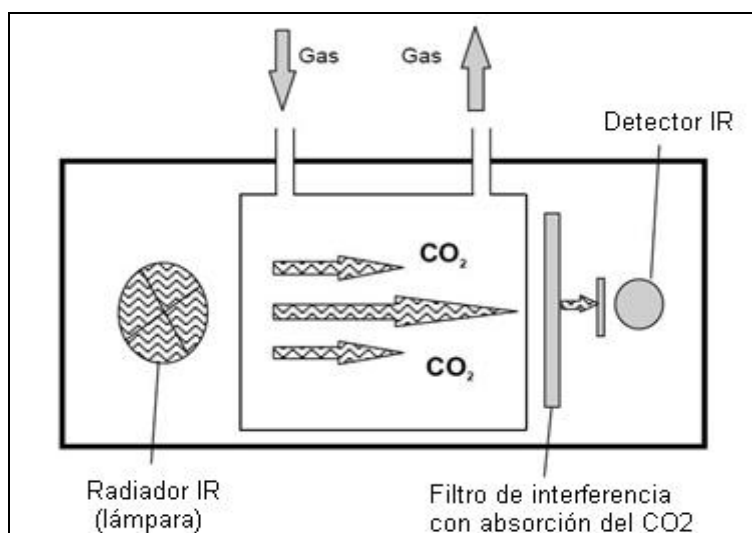
Hay dos métodos para incidir en solo un componente:

- En el método dispersivo la radiación se descompone espectralmente mediante prismas o redes de difracción antes de que el volumen de gas pase a su través, después de lo cual solamente la radiación con la longitud de onda típica del componente que se está midiendo y es de interés, atraviesa el volumen del gas (cámara de medición). Este principio se usa en particular en los dispositivos de laboratorio.
- En el método no dispersivo (método NDIR) se prescinde de la descomposición espectral descrita anteriormente, y una radiación de banda ancha, modulada con una rueda obturadora en todo el recorrido donde sea necesario, pasa a través de la cámara de medición.

Hay pues dos métodos para verificar la absorción:

- El propio componente a medir se usa en forma de un detector lleno con el mismo, de tal forma que el detector está lleno con el componente a medir y se mide la radiación residual aún presente después de que ha pasado a través de la cámara de medición, donde sea pertinente, comparando con la radiación sin atenuar. Las fluctuaciones de presión que se producen (debidas a las fluctuaciones en el calentamiento del volumen del gas como consecuencia de la absorción) se registran mediante un condensador de membrana o un sensor de micro flujo y se convierten en una señal eléctrica.
- Alternativamente, la radiación pasa a través de la sección de absorción y luego se contrae al rango de longitud de onda requerido para el CO<sub>2</sub>; por ejemplo, se verifica por medio de un filtro de interferencia usando un detector de radiación IR. A medida que aumenta la concentración del gas, se absorbe más radiación y la señal del detector se reduce en consonancia.

**Figura. 11. Sensor NDIR (diseño compacto) para medir CO<sub>2</sub>**

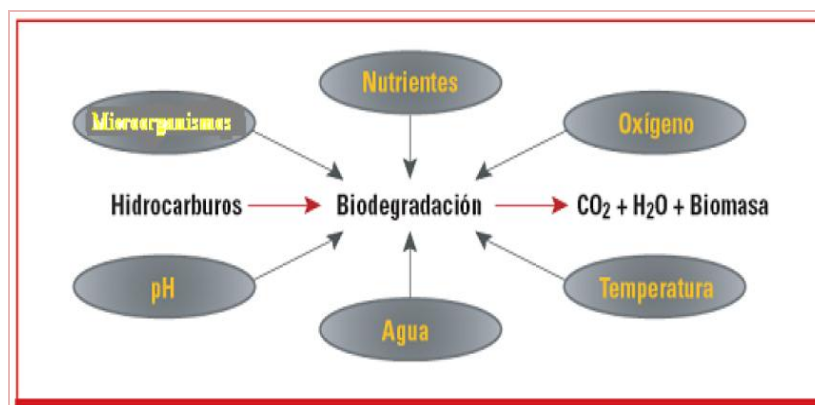


**Fuente:** <http://www.academiatesto.com.ar/cms/?q=absorcion-infrarroja-proceso-ir>

### **1.12. Capacidad de degradación de hidrocarburos totales de petróleo por los microorganismos del consorcio nativo**

Los microorganismos son especialmente útiles para el proceso de degradación de hidrocarburos, alterando la estructura molecular de estos compuestos orgánicos que inicialmente son vinculados a actividades enzimáticas extracelulares y son transportados a través de la membrana celular, entonces se producen una serie de reacciones de transformación en las cuales se separan los electrones del compuesto y se oxida la estructura del carbono. La energía desprendida en las reacciones se emplea para la síntesis de nuevo material celular, para la reparación del material dañado, el transporte de compuestos al interior de la célula y para el movimiento. Una vez que los contaminantes orgánicos han sido convertidos en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, se ha producido una mineralización.

**Figura 12. Proceso de biodegradación de hidrocarburos**



**Fuente:** [http://es.scribd.com/doc/95046740/Biotecnología-en-el-Tto de-Contaminantes-en-Agua-y-Suelo](http://es.scribd.com/doc/95046740/Biotecnología-en-el-Tto-de-Contaminantes-en-Agua-y-Suelo)

Los hidrocarburos totales de petróleo presentes en el suelo de la biopilas del pozo Sacha SA 161 fueron tomados como sustrato para la obtención de carbono por las bacterias del consorcio nativo aplicado, para que esto suceda al tener contacto los hidrocarburos con la parte externa de las células bacterianas se desencadenan una serie de procesos metabólicos, para transportar el sustrato al interior de la célula por las siguientes rutas:

- Formación de un complejo enzima-sustrato extracelular
- Degradación parcial
- Transporte directo

Tras el contacto de la bacteria con el sustrato, las enzimas extracelulares producidas por las bacterias forman complejos con las moléculas del sustrato. Estos complejos permiten al sustrato atravesar la pared celular.

Una vez en el interior de la célula, son las enzimas intracelulares las que formarán complejos con el sustrato para catalizar otras reacciones necesarias encaminadas a la obtención de energía.

Algunos compuestos orgánicos son demasiado grandes para ser transportados al interior de la célula y entonces se produce una degradación parcial en la superficie celular. Otras moléculas orgánicas pasan directamente al interior de la célula bacteriana sin necesidad de formar complejos con las enzimas. Las enzimas son

grandes moléculas proteicas compuestas principalmente por aminoácidos que se pliegan adoptando formas complejas en las que intervienen enlaces puentes de hidrógeno. Esencialmente, disminuyen la energía requerida para activar una reacción y por tanto aumentan la actividad biológica. Al actuar las enzimas como catalizadores, no se consumen en el proceso y pueden re utilizarse. En resumen las bacterias del consorcio bacteriano nativo metabolizan los hidrocarburos totales de petróleo a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas. El metabolismo libera energía y utiliza el carbono del hidrocarburo para sintetizar nuevo material celular.

Estequiométricamente toma aproximadamente 3 medidas de oxígeno para convertir una de hidrocarburos en CO<sub>2</sub> y agua.

### **1.13. El CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana**

Los suelos son sistemas que cuentan con una flora microbiana propia, la cual dependiendo de su actividad metabólica puede contribuir a la remediación de los sitios contaminados. La actividad metabólica de los microorganismos aerobios y de algunos anaerobios del suelo puede ser cuantificada por medio de la producción de CO<sub>2</sub>, el cual es un producto de la respiración de dichos microorganismos. Además, este parámetro puede estar estrechamente relacionado con la degradación de los contaminantes (Alef, 1995; Bossert y Kosson, 1997). En la respiración, que es la oxidación de la materia orgánica por microorganismos aerobios, el oxígeno funciona como el aceptor final de electrones. El producto final del proceso son CO<sub>2</sub> y agua, por lo que la actividad metabólica de los microorganismos del suelo puede ser cuantificada por la medición de la producción de CO<sub>2</sub> o consumo de O<sub>2</sub>. (Nannipieri et al., 1990). Como otras actividades metabólicas, ésta depende del estado fisiológico de las células y está influida por diferentes factores en el suelo como la humedad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y estructura del suelo. La producción microbiológica de CO<sub>2</sub> en el suelo puede ser determinada incubando el suelo en jarras, cajas de Petri cerradas o en diferentes tipos de matraces o recipientes. Una de las técnicas más sencillas para la cuantificación de CO<sub>2</sub> es adsorbiéndolo en NaOH y BaCl y determinándolo por titulación con HCl. Otros métodos para la determinación de CO<sub>2</sub> se basan en los cambios de conductividad eléctrica de la solución de NaOH o



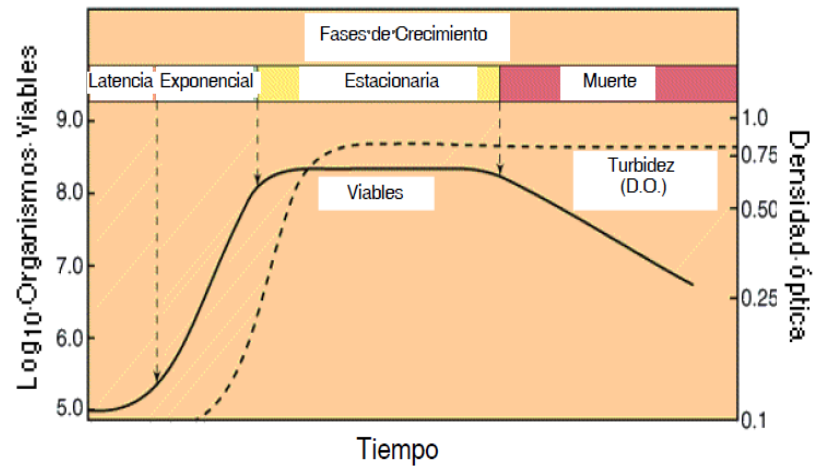
uso de cromatografía de gases (Brookes y Paul, 1987) o espectroscopia de infrarrojo. El consumo de O<sub>2</sub> también puede ser estimado por medio de un electrorrespirómetro o cromatografía de gases para determinar la actividad metabólica de los microorganismos en el suelo (Trevors, 1985).

#### **1.14. Cinética bacteriana**

El incremento en el número de células es lento al principio y después llega a ser de forma exponencial. Esta gráfica es característica de un cultivo en un recipiente cerrado en el que los nutrientes son limitados. En la curva se distinguen cuatro fases:

- *Fase de latencia.* Fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio de incubación al que han sido transferidas. Las células no crecen inmediatamente sino después de este tiempo de latencia. Las células son metabólicamente activas, se adaptan al medio y eventualmente lo modifican. Para un mismo inóculo, esta fase de latencia varía dependiendo del medio al que se transfieren y de las condiciones de incubación.
- *Fase de crecimiento exponencial.* Fase en la que las células se están dividiendo regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas durante esta fase, el grado de desarrollo es máximo. Es en este periodo donde puede calcularse el tiempo de generación de un microorganismo.
- *Fase estacionaria.* El n° de células no se incrementa más porque los nutrientes del medio se van agotando y posibles sustancias tóxicas pueden ir acumulándose. No hay incremento neto del n° de células, el n° de células que se originan es igual al n° de las que mueren.
- *Fase de muerte celular.* Las células mueren a una velocidad mayor a la que se originan debido al agotamiento total de la nutriente y/o excesiva acumulación de sustancias tóxicas. A veces la muerte va acompañada de lisis celular y esto disminuye la absorbancia del cultivo.

**Figura 13. Crecimiento de una población bacteriana**



**Fuente:** [http://es.scribd.com/doc/95046740/Biotecnologia-en-el-Tto de-Contaminantes-en-Agua-y-Suelo](http://es.scribd.com/doc/95046740/Biotecnologia-en-el-Tto-de-Contaminantes-en-Agua-y-Suelo)

Cuando seguimos el crecimiento de una población microbiana, midiendo por ejemplo su DO en función del tiempo, obtenemos su curva de crecimiento, que nos viene dada por una gráfica del tipo de crecimiento bacteriano.

## **CAPITULO II**

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. Lugar de la investigación**

La presente investigación se desarrolló en la Provincia de Orellana cantón Joya de los Sachas ubicado al Noroeste de la provincia, formando parte de la cuenca del río Napo; con una superficie urbana de 440.7 Ha, rural de 119.848 Has, con un total de 120.560 has. El campo petrolero Sacha está situado 300 km al noreste de Quito en la Región Amazónica del Ecuador, Cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana, delimitado al Norte por las estructuras Palo Rojo, Eno, Ron y Vista, al Sur por los Campos Culebra –Yulebra, al Este por los Campos Mauro Dávalos Cordero y Shushufindi – Aguarico mientras que al Oeste por los Campos Pucuna, Paraíso y Huachito. <sup>(25)</sup>

Tiene un clima tropical húmedo, se ubican en la latitud Sur 00 3´ y longitud 760 40´ con precipitaciones anuales entre 3000 y 4000 mm, con una humedad relativa entre 80 y 95 %, siendo la época lluviosa entre los meses de marzo a julio. <sup>(26)</sup>

Posee una altitud de 270 m.s.n.m. Esta limitada al Norte con la Provincia de Sucumbíos al Sur por el Cantón Puerto Francisco de Orellana al Este con la Provincia de Sucumbíos y al Oeste con el Cantón Puerto Francisco de Orellana. Posee un clima húmedo tropical con temperaturas entre 18 °C con un máximo de 42

°C. La medición del CO<sub>2</sub> se realizó in situ en la Biopila ubicada en el campo Sacha 161, la caracterización del medio físico se detalla de la siguiente manera:

### GEOLOGÍA

La superficie del terreno es plana y los drenajes han erosionado formando valles poco profundos, facilitando el drenaje de la zona.

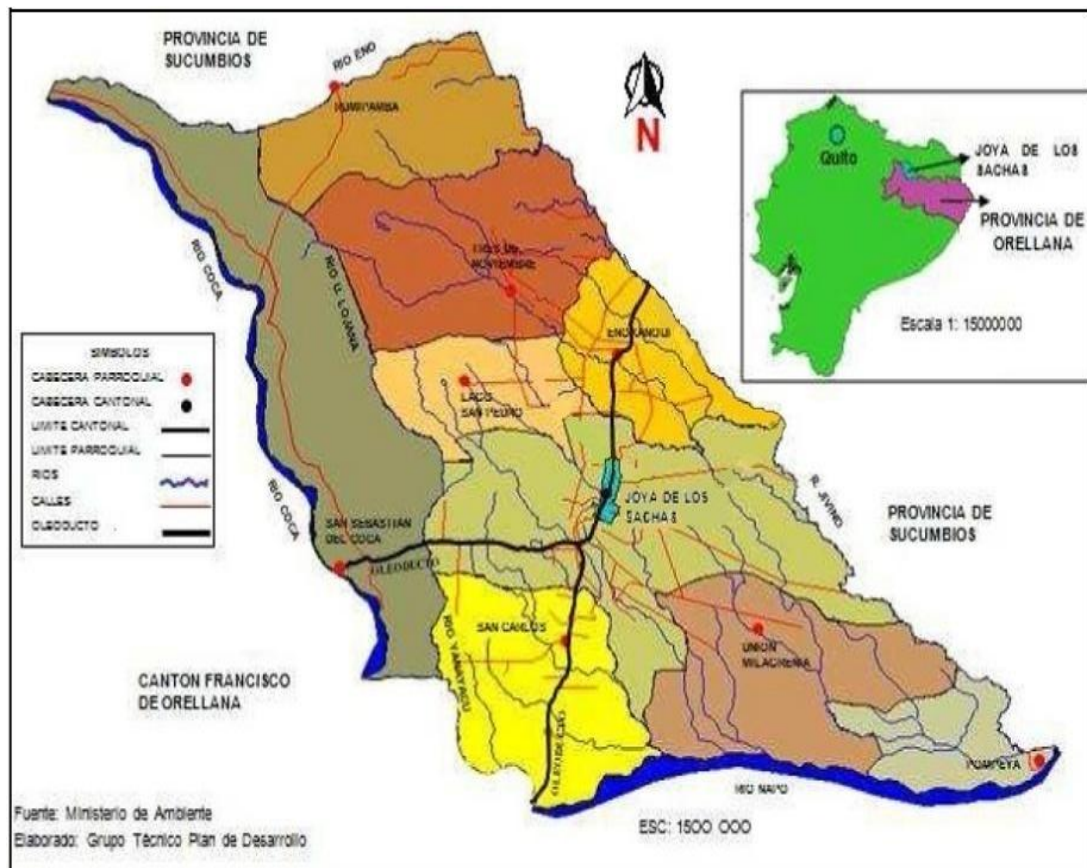
### HIDROLOGÍA

Se identificó un estero S.S.N.N. el cual es de régimen estacional básicamente y recoge aguas procedentes de vertientes o fluidos subterráneos durante la mayor parte del año.

### CLIMATOLOGÍA

Según los registros del INAMHI el clima en esta zona está clasificado como muy húmedo tropical, con brisas constantes, intensa evaporación y temperaturas altas y el cielo con nubosidad media de 6 octavos.

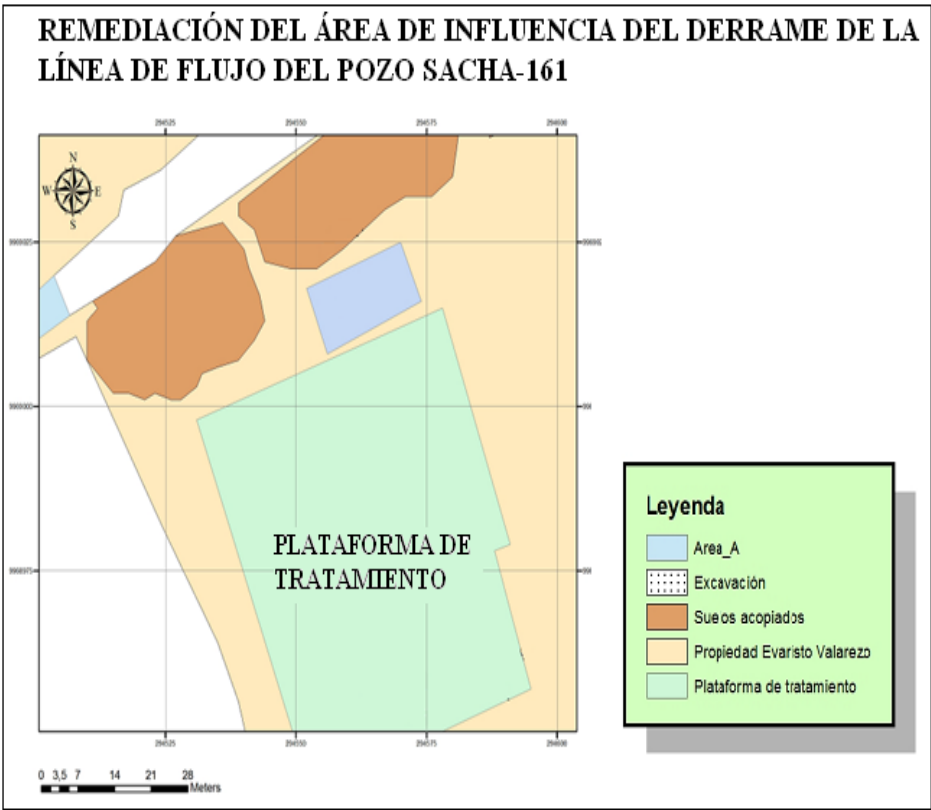
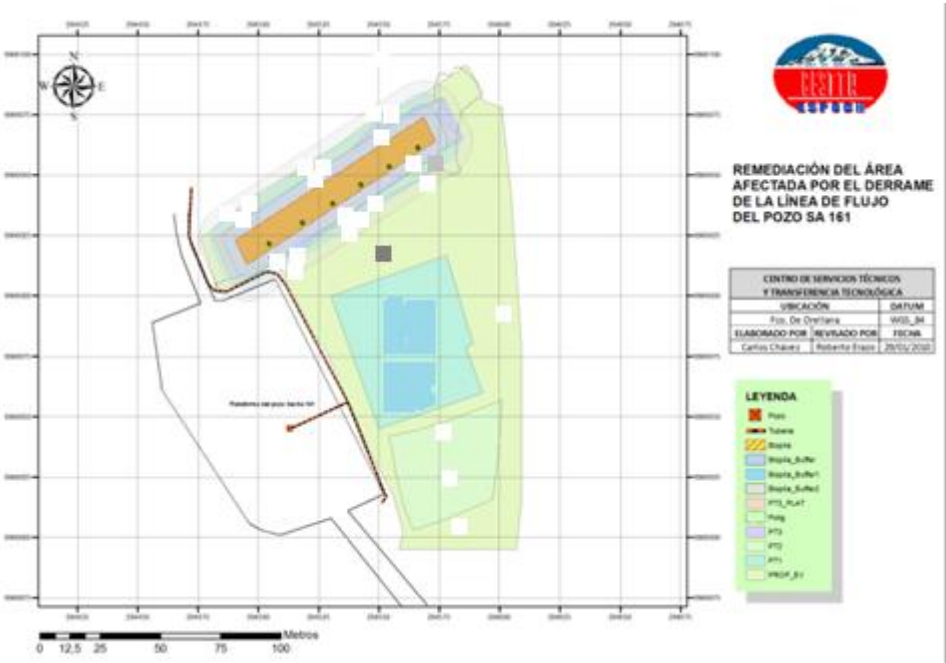
**Figura 14. Localización del campo Sacha**



**Fuente:** Laboratorio Cestta

En las siguientes figuras se muestra la mancha de contaminación así como el lugar de biorremediación y ubicación de las biopilas.

Figura 15 y 16. Localización del área utilizada para las mediciones de CO<sub>2</sub>



Fuente: Laboratorio Cestta

## 2.2. Materiales utilizados

### 2.2.1. Suelo contaminado

El suelo contaminado para la realización de las mediciones de CO<sub>2</sub> procedió del derrame de la línea de flujo del pozo SA 161. El suelo contaminado dispuesto ya en biopilas de remediación tiene un volumen de 2.793 m<sup>3</sup>.

### 2.2.2. Equipos

Para poder iniciar con la investigación se adquirió:

- ✓ Un equipo Testo X 435, para medir valores de temperatura (°C), presión (hPa), humedad (%Hr) y CO<sub>2</sub> (ppm).
- ✓ Un GPS, para tener georeferencia de los puntos donde se va a realizar las mediciones.

**Fotografía 1.** Equipos de monitoreo



**Autor:** Ghinson Guevara

## **2.3. Muestreo**

### **2.3.1. Método de muestreo**

El método de muestreo aplicado para la presente investigación es Probabilístico, Completamente Aleatorizado para “n” iguales. Para la aplicación de este método se definirá:

- Un número a cada individuo de la población y
- A través del software Excel se elegirán tantos sujetos, para este caso datos de concentración en ppm de CO<sub>2</sub> como sea necesario para completar el tamaño de muestra requerida.

### **2.3.2. Tamaño de la Muestra**

Se debe obtener:

- Muestras aleatorias de tamaño (n) para
- Cada una de las K poblaciones. Las K poblaciones se clasifican sobre la base de un solo criterio del investigador, como tratamientos o grupos diferentes.
- Se debe establecer el error estándar (se), es decir el error que aceptamos cometer al realizar la investigación.
- Se determina la varianza de la muestra. Para el caso, es el nivel de ocurrencia fijado por el investigador.

Para iniciar el método de muestreo se aplican las siguientes formulas:

#### **SUMA TOTAL DE CUADRADOS:**

$$SCT = \sum (Y_{ij})^2 - \frac{(Y_{..})^2}{n * K}$$



### SUMA DE CUADRADOS DE TRATAMIENTOS:

$$SCTr = \frac{1}{n} \sum (Y.j)^2 - \frac{(Y..)^2}{n * K}$$

### SUMA DE CUADRADOS DEL ERROR:

$$SCE = SCT - SCTr$$

- El tamaño de la muestra y de la población es:

$$n = 4$$

$$K = 4$$

- Tabla de análisis de varianza

FV (fuente de variación)	GL	SC	CM	RV	F
Tratamiento	(K-1)	SCTr	SCTr/K-1	CMTTr/CME	tabla
Error	K(n-1)	SCE	SCE/K(n-1)		
Total	Kn-1	SCT	SCT/Kn-1		

## 2.4. Metodología

La metodología aplicada para el ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DEL ANHÍDRIDO CARBÓNICO EN UN TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE SUELOS PARA LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS se desarrolló de la siguiente manera:

- a) Se colocó seis tubos de pvc de 10 cm de diámetro y 4m de largo en la biopila, los cuales fueron perforados en las partes laterales para así poder captar el gas (CO<sub>2</sub>).
- b) En el extremo se le colocó un tapón de caucho para la recuperación del gas que genera la biorremediación en la biopila.

- c) El tapón se retira para así iniciar las mediciones.
- d) Previo a realizar las mediciones se voltea la Biopila semanalmente con ayuda de una retroexcavadora, es importante mencionar que al momento del volteo se le va añadiendo urea, material esponjante y MAP (fósforo) a la biopila. El volteo tiene como finalidad ayudar la eliminación de  $\text{CO}_2$  y oxigenar el suelo.
- e) Después de cada volteo se toma una primera medición de  $\text{CO}_2$  en 20 lb de suelo colocado en una funda para así tener una medida referencial inicial.
- f) Las siguientes mediciones de  $\text{CO}_2$  diarias durante el mes de investigación se toman en los tubos de pvc, todo esto con la ayuda del equipo Testo X 435, este equipo nos permite determinar valores adicionales como temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), presión (hPa) y humedad (%Hr).

**Fotografía 2.** Ubicación de los puntos de muestreo.



**Autor:** Ghinson Guevara

**Fotografía 3.** Medición de los datos



**Autor:** Ghinson Guevara

**Fotografía 4.** Volteo de la Biopila.



**Autor:** Ghinson Guevara

## 2.5. Diseño Experimental

Para el desarrollo de la siguiente investigación se utilizó una Biopila de 2793 m<sup>3</sup> en la cual se colocaron tubos muestreadores distribuidos aleatoriamente alrededor de la misma. La investigación consistió en los seis puntos de medición en la biopila y un punto en un blanco en los cuales se realizaba mediciones diarias de CO<sub>2</sub>. La investigación se fundamentó en una valoración y evaluación de un tratamiento físico-químico para biorremediar el suelo contaminado por hidrocarburos. A esta biopila se le realiza un volteo semanal en el cual se aplica la técnica de bioestimulación con MAP, urea y mediante la inoculación de un consorcio bacteriano nativo aislado, conformado por 6 cepas bacterianas de los géneros:

- Bacillus circulans
- Bacillus subtilis
- Bacillus macerans
- Bacillus brevis

Este grupo de bacterias aerobias son inocuas por lo cual no representan riesgo para la salud de las personas, animales o plantas y el inóculo se lo puede utilizar con seguridad.

### TIPO DE MODELO

Para esta investigación se vio la necesidad de trabajar con un tipo de Modelo matemático el cual será descrito a continuación:

### MODELO MATEMÁTICO COMPLETAMENTE ALEATORIZADO

En este tipo de modelo el investigador determina la aceptación o rechazo de las variables (dependiente e independiente) para comprobar la eficiencia de las bacterias en el proceso de biodegradación de los hidrocarburos presentes en el suelo (Biopila) utilizando el método de medición de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.** Diseño de la Investigación

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
<b>S1</b>	S1M1	S2M1	S3M1	S4M1
<b>S2</b>	S1M2	S2M2	S3M2	S4M2
<b>S3</b>	S1M3	S2M4	S3M3	S4M3
<b>S4</b>	S1M4	S2M4	S3M4	S4M4

**Autor:** Ghinson Guevara

**Semanas** = se hará la investigación en 4 semanas diferentes.

**M** = promedio mediciones por día.

### PARÁMETROS DE CONTROL

Es recomendable que se tome en cuenta parámetros de control durante el proceso de esta investigación los cuales son determinados en conjunto con la medición de CO<sub>2</sub>, siendo estos los siguientes:

- Temperatura
- Humedad

### PARÁMETROS DE MEDICIÓN

Los parámetros a medir en la biopila para demostrar que a mayor concentración de CO<sub>2</sub> existe mayor efectividad de trabajo de las bacterias se basa en lo descritos en la Tabla 6 de la RAHOE tomando como referencia los límites permisibles para uso de suelo agrícola de TPH's al inicio y al final de la investigación.

## **2.6. Métodos**

**Tabla 6.** Métodos de Análisis

<b>PARÁMETRO</b>	<b>MÉTODO</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Infrarrojo
<b>Hidrocarburos totales de petróleo(TPH)</b>	Cromatografía de gases

**Fuente:** Laboratorio Cestta

## **CAPITULO III**

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Activación de las Bacterias en la Biopila**

Para facilitar la medición de CO<sub>2</sub> en la biopilas, la activación de las bacterias en el proceso de biorremediación se la realizaba añadiendo por medio de aspersión la bacteria nativa conjuntamente con urea, material esponjante MAP (fósforo), todo esto con la finalidad de facilitar las mediciones y tener los resultados esperados.

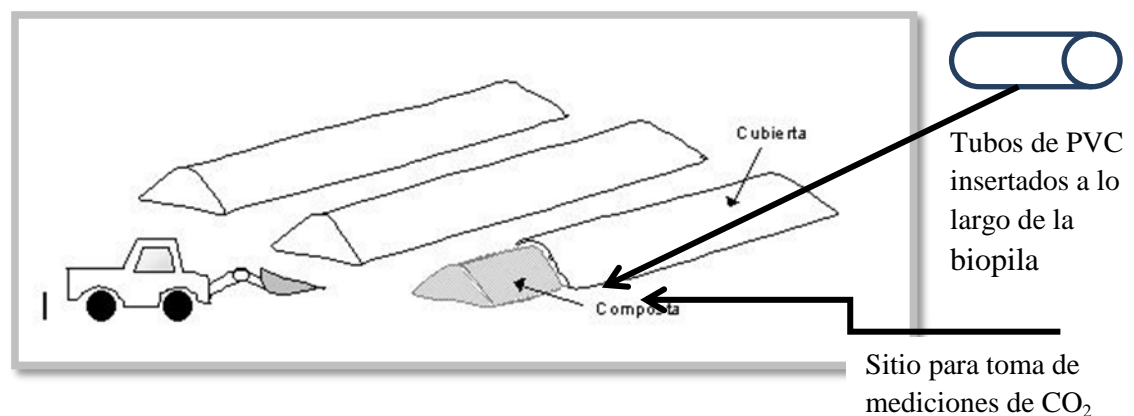
##### **3.1.1. Materiales equipos y reactivos**

- Botas de caucho
- Camisas lee
- Cascos
- Fundas de basura
- Tubos PVC de 10 cm de diámetro y 4 m de largo
- Tapones de caucho
- Guantes

### 3.1.2. Procedimiento

- Recolectar 20 kg aproximadamente de muestra inicial de suelo (biopilas) en una funda de basura para la medición inicial de CO<sub>2</sub> con la ayuda del equipo.
- Con el dato inicial obtenido, proceder a tomar las mediciones de CO<sub>2</sub> en la biopila.
- Las mediciones se toman en la mañana y en la tarde teniendo un total de cuatro mediciones en el día.
- Las mediciones se archivan en la base de datos del equipo.
- Para la obtención de resultados finales sacar un promedio de las mediciones en el día y en la tarde.

**Figura 17. Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas**



**Fuente:** Instituto Nacional de Ecología de Mexico

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Mediciones de CO<sub>2</sub> en la biopila para determinar el grado de actividad de las bacterias para la reducción de TPH's.

Durante la investigación para comprobar la remediación del suelo contaminado mediante biopilas, se realizaron mediciones diarias de CO<sub>2</sub> en la mañana y en la tarde durante un mes. Adicional a las mediciones base establecidas, se tomaron datos puntuales de temperatura como apoyo para el proceso de reducción de hidrocarburos presentes en el suelo dispuesto en la biopila. Cabe mencionar que para tener una comparación entre el grado de reducción de hidrocarburos vs la cantidad de CO<sub>2</sub> desprendida y el trabajo de las bacterias durante la biorremediación, se tomará en cuenta mediciones de TPH's analizados semanalmente por el mes de investigación.

**Tabla 7.** Mediciones de CO<sub>2</sub> (ppm) y temperatura (°C) durante el mes de investigación.

SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4	
CO <sub>2</sub>	TEMPERATURA	CO <sub>2</sub>	TEMPERATURA	CO <sub>2</sub>	TEMPERATURA	CO <sub>2</sub>	TEMPERATURA
690	24.7	566	30.6	1650	34.7	2824	31.8
666	24.8	535	30.3	1112	34.9	2299	32.4
366	24.2	447	35.5	1842	35	2539	33.6
397	26.7	1260	33.1	1560	32.5	384	33.3

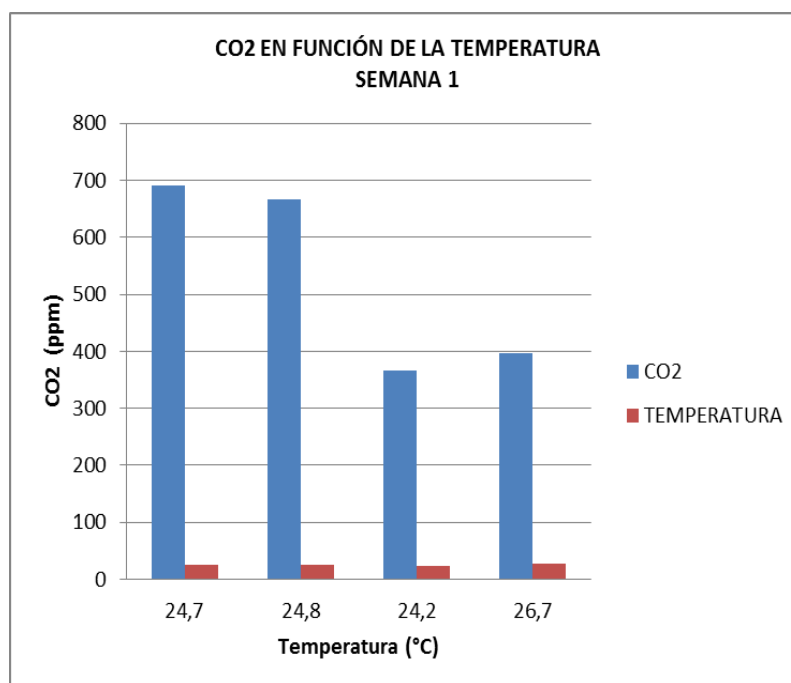
**Autor:** Ghinson Guevara



#### 4.2. Mediciones de CO<sub>2</sub> en función de la temperatura

Con los datos obtenidos en las mediciones se compara la relación de generación de CO<sub>2</sub> vs Temperatura.

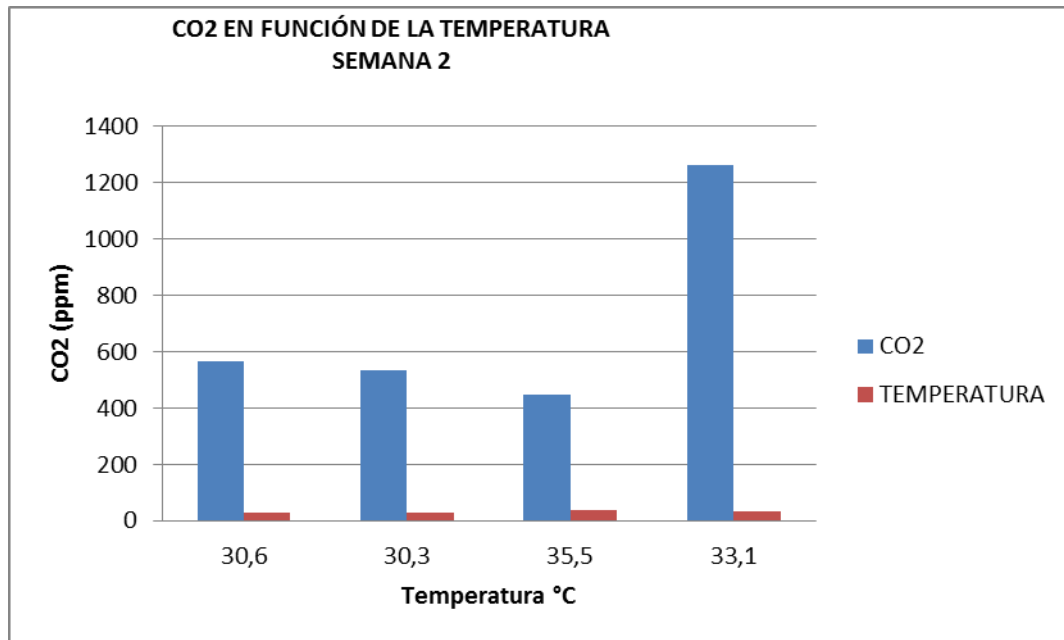
**Figura 18. CO<sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 1**



**Autor:** Ghinson Guevara

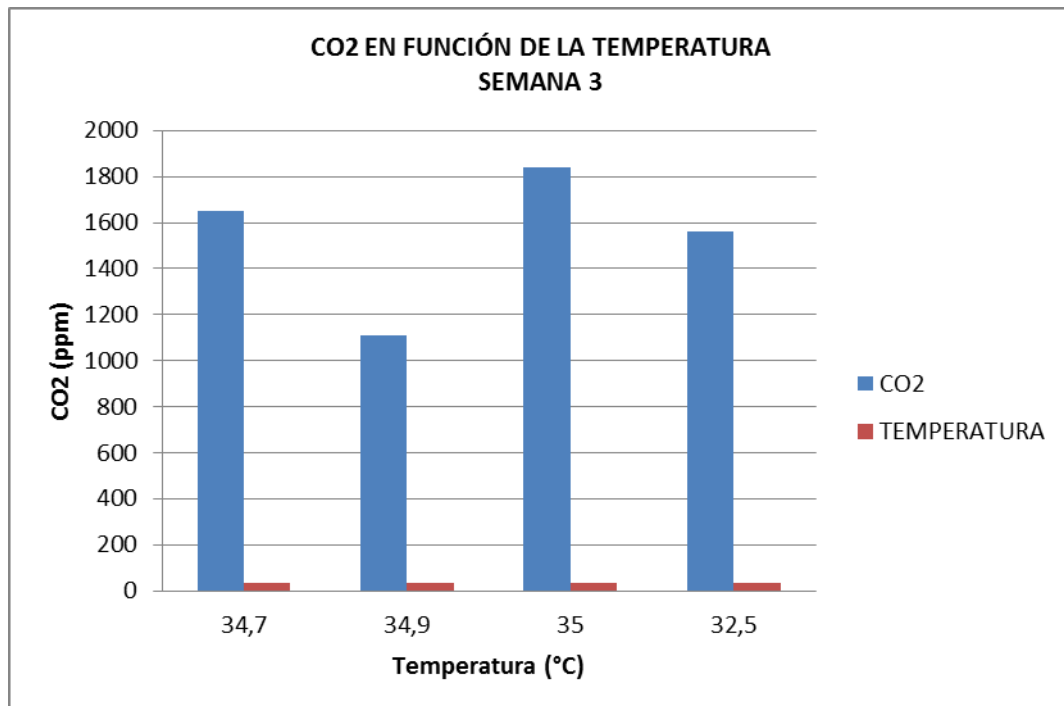
Según la gráfica de acuerdo a los resultados obtenidos de las mediciones de CO<sub>2</sub> VS la Temperatura, se puede apreciar que, la temperatura no es directamente proporcional a la cantidad de CO<sub>2</sub> eliminada.

**Figura 19. CO<sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 2.**



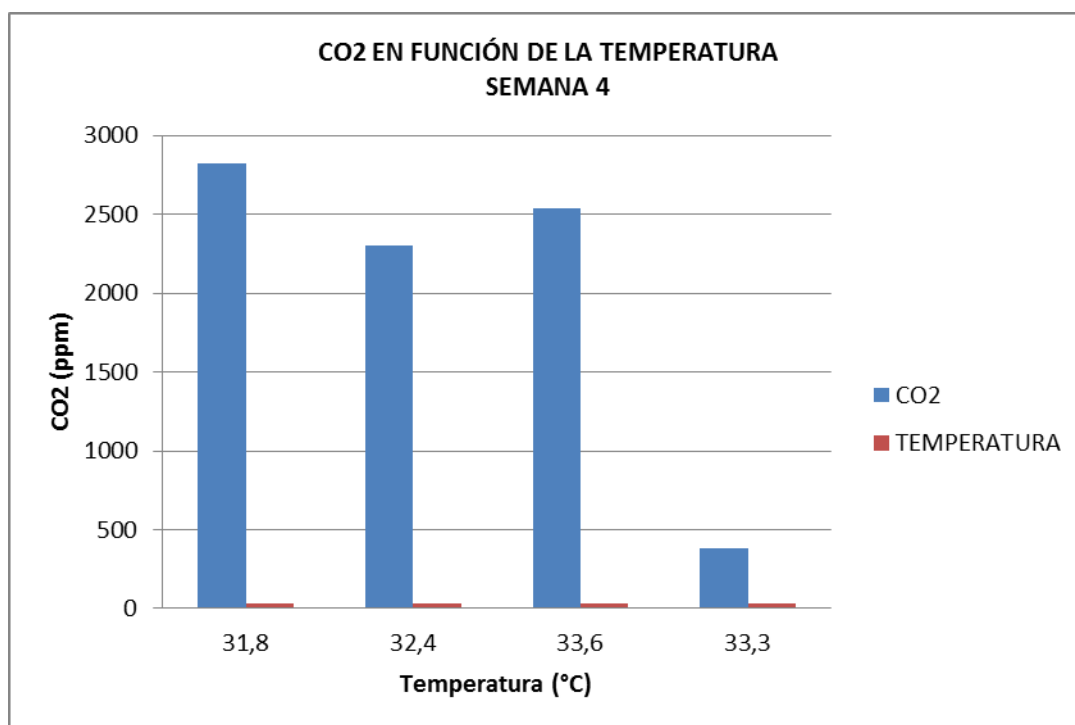
**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 20. CO<sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 3**



**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 21. CO<sub>2</sub> en función de la temperatura, Semana 4**



**Autor:** Ghinson Guevara

Con la graficas de las semanas 2, 3 y semana 4, podemos hacer una comparación con la semana 1, manteniendo el criterio de que la temperatura no es directamente proporcional a la cantidad de CO<sub>2</sub> eliminada, sin embargo es necesario enunciar que en todas las gráficas se puede apreciar picos considerables de eliminación de CO<sub>2</sub>, esto debido a que existen periodos de inoculación de las bacterias durante la biorremediación.

#### **4.3. Mediciones de CO<sub>2</sub> en función de los TPH's por semana**

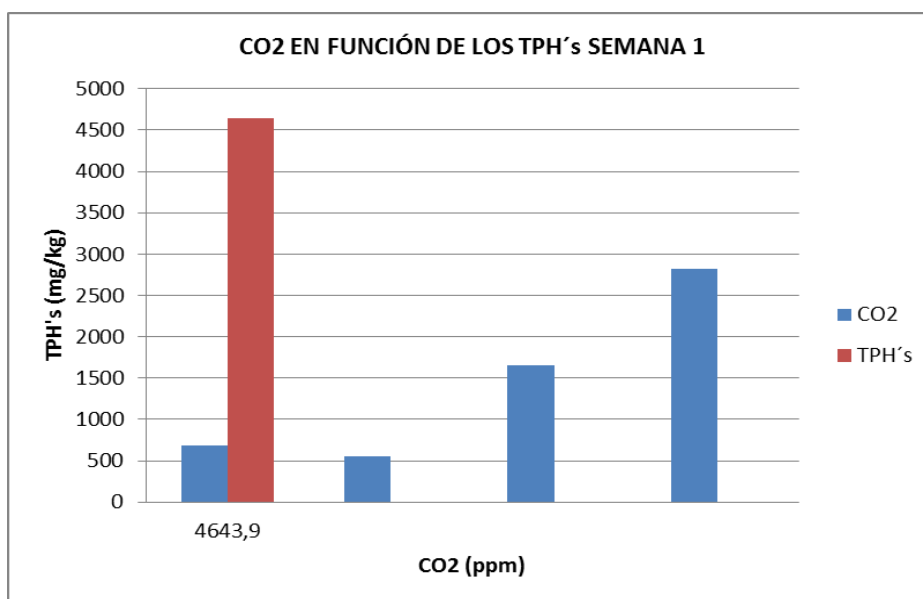
Con los datos obtenidos en las mediciones se compara la relación de generación de CO<sub>2</sub> vs la reducción de TPH's en el suelo contaminado.

**Tabla 8.** Mediciones de CO<sub>2</sub> (ppm) y TPH's (mg/kg) durante el mes de investigación.

SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4	
CO <sub>2</sub>	TPHs	CO <sub>2</sub>	TPHs	CO <sub>2</sub>	TPHs	CO <sub>2</sub>	TPHs
690	4643.9	666	2496.4	366	1265.07	397	1336.37
556		535		447		1260	
1650		1112		1842		1560	
2824		2299		2539		384	

**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 22.** CO<sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 1

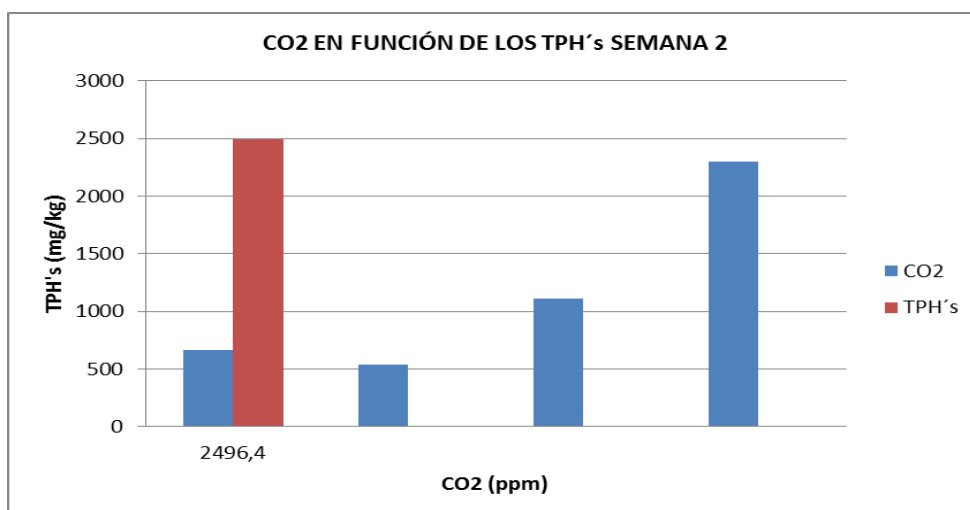


**Autor:** Ghinson Guevara

Como se puede apreciar en la gráfica, al inicio de la biorremediación la concentración de TPH's es elevada, asumiendo que de acuerdo a la tabla 6 de la RAHOE se encuentra fuera de los límites permisibles.

Las concentraciones iniciales de CO<sub>2</sub> como indica la gráfica son bajas pues durante la primera semana de biorremediación las bacterias nativas inician su proceso de inoculación para comenzar la producción y a la vez la eliminación de CO<sub>2</sub>.

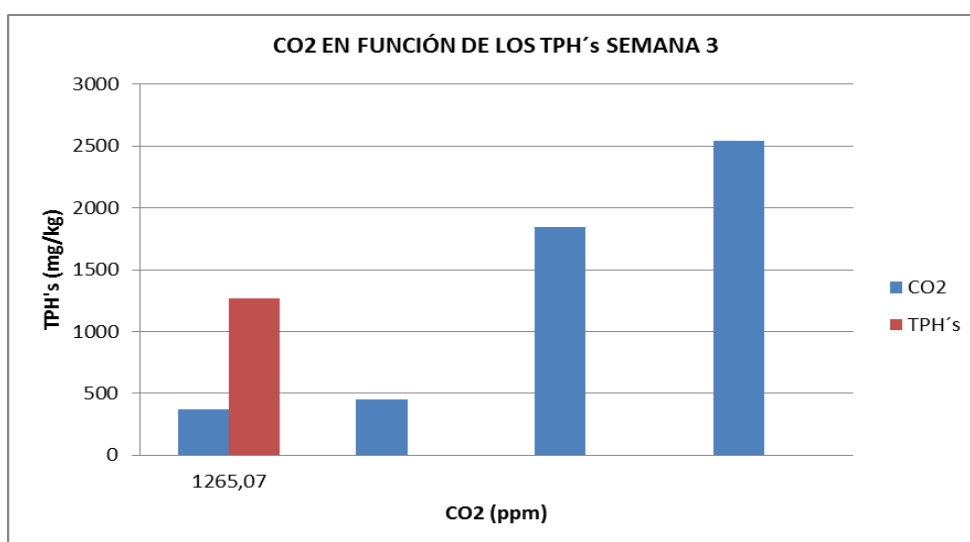
**Figura 23. CO<sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 2**



**Autor:** Ghinson Guevara

En la gráfica se demuestra que en relación a la concentración de TPH's de la semana 1 siendo un valor de 4643,9 mg/kg en comparación con la semana 2 teniendo un valor de TPH's de 2496,4 mg/kg existe una considerable reducción del 46,25 % de este tipo de contaminante, por lo tanto la cantidad de CO<sub>2</sub> generado ha aumentado como muestra la gráfica, ya que las bacterias nativas han iniciado eficientemente su trabajo de degradación de los hidrocarburos.

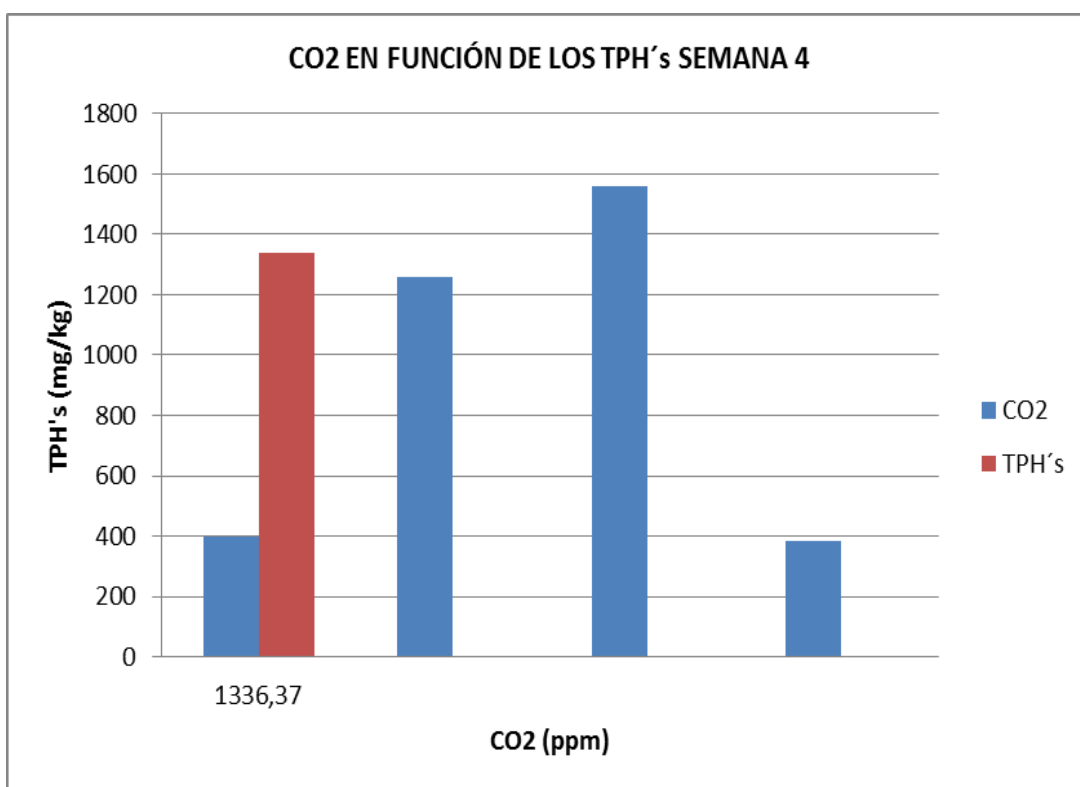
**Figura 24. CO<sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 3**



**Autor:** Ghinson Guevara

En relación a la concentración de TPH's de la semana 1 siendo un valor de 4643,9 mg/kg en comparación con la semana 3 teniendo un valor de TPH's de 1265,07 mg/kg existe una reducción del 72,76 % de este tipo de contaminante, sin embargo la cantidad de CO<sub>2</sub> generado es variable, pues está directamente relacionado con las inoculaciones que se dan semanalmente en la biopila.

**Figura 25. CO<sub>2</sub> en función de la reducción de TPH's - Semana 4**



**Autor:** Ghinson Guevara

En esta última semana de mediciones se puede evidenciar notoriamente la disminución de los TPH's con un valor final de 1336 mg/kg siendo este ya un valor dentro de los parámetros ambientales exigidos para un suelo agrícola. Teniendo de esta manera un porcentaje de degradación del 71,3%. Sin embargo los niveles de generación de CO<sub>2</sub> han disminuido conjuntamente con la inoculación de la bacteria en la biopila.

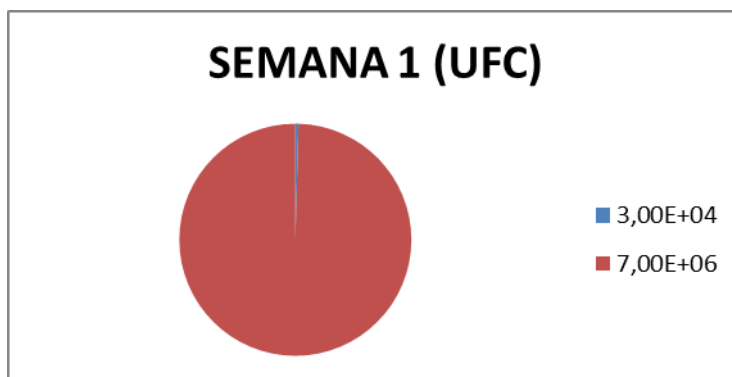
#### 4.4. Crecimiento bacteriano (UFC) semanal

**Tabla 9.** Crecimiento bacteriano

	Inicio	Final
Semana 1 (UFC)	3,00E+04	7,00E+06
Semana 2 (UFC)	1,20E+09	1,50E+11
Semana 3 (UFC)	6,00E+05	8,00E+07
Semana 4 (UFC)	4,00E+04	6,00E+05

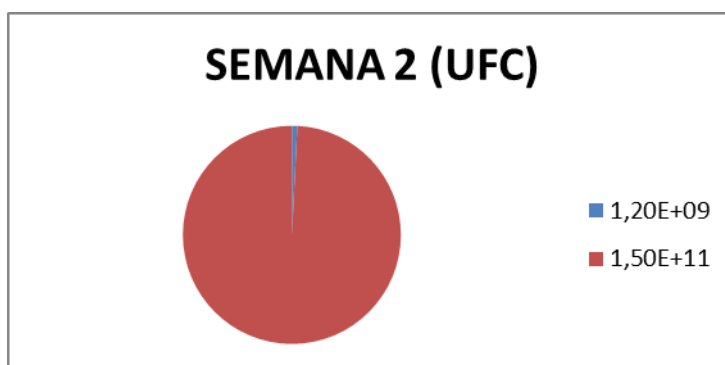
**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 26.** Crecimiento bacteriano semana 1



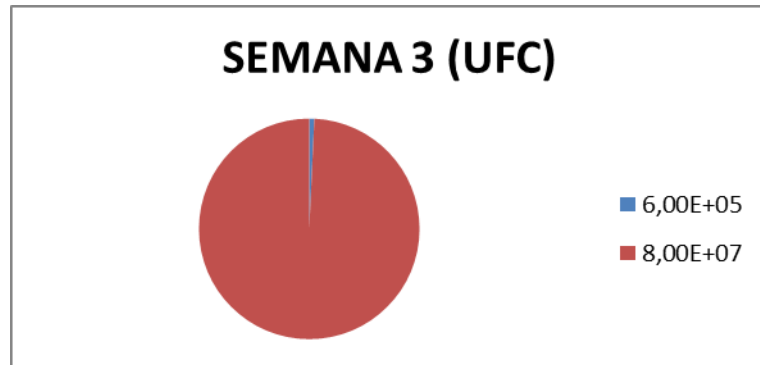
**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 27.** Crecimiento bacteriano semana 2



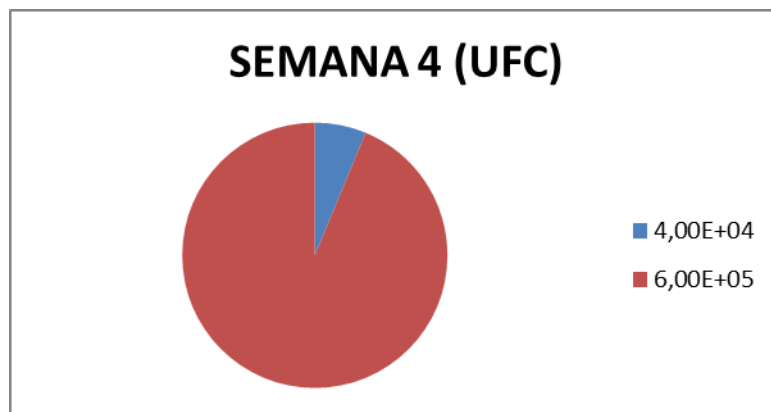
**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 28. Crecimiento bacteriano semana 3**



**Autor:** Ghinson Guevara

**Figura 29. Crecimiento bacteriano semana 4**



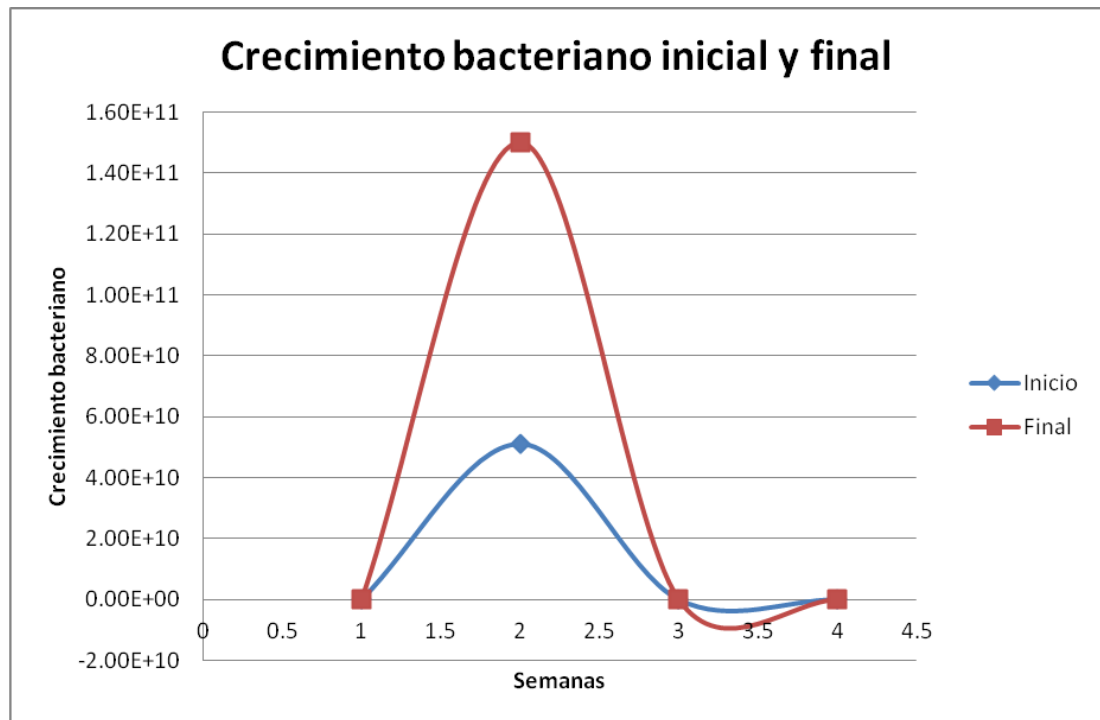
**Autor:** Ghinson Guevara

Como se puede apreciar en las gráficas:

En las mediciones iniciales de la semana 1, 2, 3 y 4 se pueden apreciar valores relativamente bajos en relación a las mediciones finales, esto se debe a que inicialmente en cada semana se realizó un volteo de la biopila, seguido de una inoculación, la cual permitió elevar el crecimiento bacteriano.



**Figura 30. Curvas de crecimiento bacteriano inicial y final**



**Autor:** Ghinson Guevara

## **CAPITULO V**

### **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. Conclusiones**

- Mediante la caracterización inicial del suelo contaminado con hidrocarburos, se determinó que la concentración de los TPH's fue de 4643,9 mg/Kg encontrándose fuera de los límites permisibles establecidos en la tabla 6 del Reglamento Ambiental para Operaciones Hidrocarburíferas Decreto 1215 (<2500 mg/kg) para suelo agrícola.
- El estudio de la cinética de degradación de hidrocarburos totales de petróleo desarrollado en esta investigación; permitió mediante la medición diaria de CO<sub>2</sub> evaluar la eficacia del tratamiento biológico utilizando la técnica de biopilas con inoculación de bacterias nativas.
- La cuantificación de los resultados obtenidos respecto a la de generación de CO<sub>2</sub> debido a la actividad microbiana durante el proceso de biorremediación del suelo presentó un rango variable de concentración con un mínimo de 336 ppm y un máximo de 2824 ppm.
- Durante la primera etapa del tratamiento biológico se registraron bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> debido a que los microorganismos inoculados se

encuentran en la etapa de adaptación y el inicio de sus procesos metabólicos de degradación, en el transcurso de los días la concentración de CO<sub>2</sub> se fue incrementando debido al aumento de la actividad metabólica, en la etapa final del proceso se registraron valores de CO<sub>2</sub> más bajos que los iniciales debido a la reducción de la concentración de TPH's y por lo tanto de fuentes de carbono.

- El presente estudio permitió establecer que no existe una relación directa entre la temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> durante el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo mediante la técnica de biopilas con adición de bacterias nativas.
- El proceso de degradación de hidrocarburos nos permite evaluar la actividad microbiana mediante las mediciones continuas de CO<sub>2</sub>.
- El proceso de biorremediación aplicando la técnica de biopilas con adición de bacterias nativas en un volumen de suelo contaminado de 2793 m<sup>3</sup> presentó una eficacia del 72,03 % de degradación de hidrocarburos totales de petróleo en un tiempo de cuatro semanas, teniendo un valor final de 1336,37 mg/kg.
- Mediante las mediciones de CO<sub>2</sub> se pudo llevar un óptimo control del trabajo eficiente en el proceso de biodegradación que realizan las bacterias nativas, determinando de esta manera lo eficiente que resulta el método de inoculación para así dar paso a cumplir parámetros de normativas ambientales que rigen en el país.
- La técnica de inoculación en la biopila como alternativa para la descontaminación de suelos para uso agrícola, da resultados óptimos para mejorar la calidad del suelo y las condiciones ambientales.

## 5.2. Recomendaciones

- Realizar una caracterización de las condiciones iniciales del suelo contaminado que determine entre otros parámetros la cantidad de nutrientes presentes, las características físicas y la riqueza microbológica a fin de controlar posibles desviaciones al proceso de biorremediación.
- Colocar el sistema de recolección de CO<sub>2</sub> en las biopilas de tratamiento biológico de manera perpendicular para facilitar el proceso de captación y evitar pérdidas.
- Realizar mediciones de CO<sub>2</sub> previo el inicio del proceso de inoculación con el fin de tener un valor de referencia de las condiciones iniciales de operación.
- Realizar un estudio preliminar del comportamiento de las bacterias nativas que van a ser aplicadas en el proceso de biodegradación de TPH's.
- Incluir el parámetro de CO<sub>2</sub> como una variable de control en los procesos biológicos de biorremediación ya que es una manera práctica y eficiente de verificar el proceso y la actividad microbiana.
- Realizar un estudio comparativo para la medición de CO<sub>2</sub> entre la técnica de determinación infrarroja y la técnica de respirometría.
- Realizar calibraciones anuales de los equipos utilizados para la determinación de las concentraciones de CO<sub>2</sub> en procesos biológicos de remediación a fin de evitar datos erróneos.

## **CAPITULO VI**

### **6. BIBLIOGRAFÍA**

**1.ALEXANDER, M.,**Biodegradation and Bioremediation., 2da. ed.,

San Diego – EEUU., Academic., 1994.,Pp 302.

**2. DOMENECH, X.,** Impacto ambiental de los residuos., 2da. ed.,

Madrid- España., Miraguano Ediciones., 1994., Pp.50 – 75.

**3. ERCOLI, E. y otros.,** Análisis y evaluación de parámetros críticos en

Biodegradación de Hidrocarburos en suelos., 2da. ed.,

Neuquem-Argentina., Abadengo., 2001., Pp.86 – 110.

- 4. PAZMIÑO, J.,** Biorremediación de suelos contaminados con  
Petróleo., 4ta. ed., Caracas-Venezuela., Días de Santos.,  
2002., Pp. 156.
- 5. SANCHEZ, A.,** Compostaje de subproductos de almazaras con  
Sistemas de dos fases., 2da. ed., Madrid-España., Ecoliva.,  
2000., Pp. 26-49.
- 6. ARROYO, M.,** Biorremediación., 2da. ed., Valencia-España., Mc  
Graw Hill., 2004., Pp. 234-319.  
  
[http://www.Aguas.igme.es/igme/publica/con\\_recu\\_acuiferos\\_028.pdf](http://www.Aguas.igme.es/igme/publica/con_recu_acuiferos_028.pdf)
- 7. CERON, K.,** El Petróleo y la Petroquímica., 2da. ed., Caracas-  
Venezuela., Dias de Santos., 2002., Pp. 156.  
  
<http://www.monografias.com/trabajos12/petrol/petrol.shtml>.
- 8. GARCÍA, C.,** Contaminación por hidrocarburos., 2da. ed., Cali –  
Colombia., Morejón., 2005., Pp. 188  
  
<http://www.prodiversitas.bioetica.org/des13.htm>

**9. CELIS, J.,** Derrame de Petróleo, efecto sobre los seres vivos y el

Ecosistema., 2da. ed., Buenos Aires – Argentina., 2006., Pp.

156.

<http://www.biodisol.com/medio-ambiente/derrame-de-petroleo-catastrofe-ecologica-efecto-sobre-los-seres-vivos-y-el-ecosistema-medio-ambiente-contaminacion-ambiental/>

**10. BAEZA, J.,** Hidrocarburos., 2da. ed., Madrid – España., 1996.,

Pp. 187

<http://www.uv.es/baeza/cqtema9.html>

**11. INCAURGAT, M.,** Hidrocarburos "El petróleo", 2da. ed., Buenos Aires Argentina., 2005., Pp. 200-226.

<http://www.monografias.com/trabajos10/petro/petro.shtml>.

**12. SINEIRO, N.,** Impactos ambientales del transporte de petróleo.,

2003., Pp. 157 - 170

<http://www.scribd.com/doc/2883973/Impactos-ambientales-del-petroleo>

**13. VINUEZA, E.,** Tipos de Petróleo., Quito-Ecuador.,  
Ecuoffset., 2004., Pp. 20.

<http://www.repsolypf/petroleo/tipos.com/2004.html>

**14. AYCACHI, R.,** Biotecnología en el tratamiento de contaminantes en  
Agua y suelo., Continental., 2011., Cajamarca-  
Perú., Pp. 123-145

[http://es.scribd.com/doc/95046740/Biotecnologia-en-el-Tto-  
de-Contaminantes-en-Agua-y-Suelo](http://es.scribd.com/doc/95046740/Biotecnologia-en-el-Tto-de-Contaminantes-en-Agua-y-Suelo)

**15.ECUADOR.,** SUBSECRETARIA DE PROTECCION


AMBIENTAL., Ministerio de Energía y Protección  
Ambiental., Reglamento sustitutivo del reglamento  
Ambiental para las operaciones hidrocarburíferas en el  
Ecuador., Decreto ejecutivo No 1215; 2001., Quito-  
Ecuador., 2001., Pp. 57.



**ANEXOS**

# **ANEXOS**

## ANEXO 1. INFORMES DE RESULTADOS

 <p>LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 1/2 Teléfono: (03)2968-910 Ext. 169</p>	 <p>ENSAYOS Nº OAE LE DC 06-008</p>
--	--	--

**INFORME DE ENSAYO N°:** 0766  
**ST:** 10 – 0106 ANÁLISIS DE SUELOS

**Nombre Peticionario:** PROYECTO DE BIORREMEDIACIÓN SACRA 161  
**dir.:** Ing. Carlos Clavero  
**Dirección:** Panamericana Sur Km 1 1/2 Riobamba, Chimborazo

**FECHA:** 10 de Junio de 2010  
**NÚMERO DE MUESTRAS:** 1  
**FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:** 2010/06/05 – 09:30  
**FECHA DE MUESTREO:** 2010/06/04 – 11:45  
**FECHA DE ANÁLISIS:** 2010/06/05 – 2010/06/12  
**TIPO DE MUESTRA:** Suelo  
**CÓDIGO LAB-CESTTA:** LAB-S 2145-10  
**CÓDIGO DE LA EMPRESA:** FTS L2  
**PUNTO DE MUESTREO:** FTS  
**ANÁLISIS SOLICITADO:** Tabla 6 RACHS  
**PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:** Ing. Carlos Clavero  
**CONDICIONES AMBIENTALES:** T ~~ambiente~~ 24.0 °C T ~~agua~~ 20.0°C

### RESULTADOS ANALÍTICOS:


PARÁMETROS	FEI-LAB-CESTTA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	MÉTODO (NORMA)
Hidrocarburos totales	FEI-LAB-CESTTA/05 TNOC 1005	mg/kg	6642,90	2500	± 20%
Hidrocarburos aromáticos poliaromáticos	FEI-LAB-CESTTA/03 EPA 504-888 MÉTODO 8100	mg/kg	<0,5	<1	± 5%
Cadmio	FEI-LAB-CESTTA/03 EPA 3050B, AFHA, 3050B, 3111 B	mg/kg	<0,5	<1	± 20%
Níquel	FEI-LAB-CESTTA/01 EPA 3050B, AFHA, 3050B, 3111 B	mg/kg	<60	<60	± 20%
Pomo	FEI-LAB-CESTTA/09 EPA 3050B, AFHA, 3050B, 3111 B	mg/kg	<60	<100	± 20%



### OBSERVACIONES:

- Muestra transportada en refrigeración.
- Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en toda las fases de la industria, hidrocarburos, incluidas las estaciones de servicios. Uso agrícola. Tabla 6 RACHS.

### RESPONSABLES DEL INFORME:

  
**Dr. Marcelo Álvarez**  
**RESPONSABLE TÉCNICO**

  
**Dr. Nancy Veloz M.**  
**JEFE DE LABORATORIO**

 <p>LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfono: (03)2968-910 Ext. 169</p>	 <p>ENSAYOS No. OAE I.E. DC 86-888</p>
--	--	---

<b>INFORME DE ENSAYO No. ST:</b>	0839 10- 0110 ANÁLISIS DE SUELOS
<b>Nombre Peticionario:</b>	PROYECTO DE BIORREMEDIACIÓN SACRA 161
<b>Dir.:</b>	Ing. Carlos Chávez
<b>Dirección:</b>	Panamericana Sur Km. 1 ½, Riobamba, Chimborazo
<b>FECHA:</b>	21 de Junio de 2010
<b>NÚMERO DE MUESTRAS:</b>	1
<b>FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:</b>	2010 / 06 / 14 - 09:00
<b>FECHA DE MUESTREO:</b>	2010 / 06 / 12 - 1400
<b>FECHA DE ANÁLISIS:</b>	2010 / 06 / 14 - 2010 / 06 / 21
<b>TIPO DE MUESTRA:</b>	Suelo
<b>CÓDIGO LAB-CESTTA:</b>	LAB-S 2006-10
<b>CÓDIGO DE LA EMPRESA:</b>	FTS 1.2
<b>PUNTO DE MUESTREO:</b>	FTS
<b>ANÁLISIS SOLICITADO:</b>	Tabla 6 RACHG
<b>PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:</b>	Ing. Carlos Chávez
<b>CONDICIONES AMBIENTALES:</b>	T <sup>ambiente</sup> = 24.0 °C T <sup>agua</sup> = 20.0 °C

**RESULTADOS ANALÍTICOS:**


PARÁMETROS	FEI-LAB/CESTTA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	MÉTODO (NORMA)
Hidrocarburos totales	FEI-LAB/CESTTA/06 TBOCC 1005	mg/kg	3496,40	2500	± 15%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	FEI-LAB/CESTTA/03 EPA SW-846 MÉTODO 8100	mg/kg	<0,5	<2	± 5%
Cadmio	FEI-LAB/CESTTA/03 EPA 200.9, AASHA 2005B, 2111 B	mg/kg	<0,5	<2	± 30%
Níquel	FEI-LAB/CESTTA/01 EPA 200.9, AASHA 2005B, 2111 B	mg/kg	<40	<50	± 30%
Pomo	FEI-LAB/CESTTA/09 EPA 200.9, AASHA 2005B, 2111 B	mg/kg	<40	<100	± 35%



**OBSERVACIONES:**

- Muestra transportada en refrigeración
- Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en toda las áreas de la industria, hidrocarburos, unidades las emisiones de servicios. De acuerdo, Tabla 6 RACHG.

**RESPONSABLES DEL INFORME:**

  
Dr. Néstor Méndez  
RESPONSABLE TÉCNICO

  
Dr. Nancy Valdez M.  
JEFE DE LABORATORIO

 <p>LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</p>	<p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>FACULTAD DE CIENCIAS Panamericana Sur Km. 1 1/2 Teléfono: (03)2968-010 Ext. 169</p>	 <p>ENSAYOS No OAE LE DC 06-008</p>
--	--	--

<b>Informe de Ensayo No. ST:</b>	1049 10- 0130 ANÁLISIS DE SUELOS
<b>Nombre Peticionario:</b>	PROYECTO DE BIORREMEDIACIÓN SACRA 161
<b>dir.</b>	Ing. Carlos Chávez
<b>Dirección:</b>	Panamericana Sur Km 1 1/2 Riobamba, Chimborazo
<b>FECHA:</b>	30 de Julio de 2010
<b>NUMERO DE MUESTRAS:</b>	1
<b>FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:</b>	2010 /07 / 19 - 10:30
<b>FECHA DE MUESTREO:</b>	2010 /07 / 16
<b>FECHA DE ANÁLISIS:</b>	2010 /07/ 19- 2010 /07/20
<b>TIPO DE MUESTRA:</b>	Suelo
<b>CÓDIGO LAB-CESTTA:</b>	LAGNS 2596-10
<b>CÓDIGO DE LA EMPRESA:</b>	PTZ L2
<b>PUNTO DE MUESTREO:</b>	Plataforma 075
<b>ANÁLISIS SOLICITADO:</b>	Tabla 6 EACNE
<b>PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:</b>	Ing. Carlos Chávez
<b>CONDICIONES AMBIENTALES:</b>	T <del>ambiente</del> 24.0 °C. T <del>agua</del> 20.0°C


**RESULTADOS ANALÍTICOS:**


PARÁMETROS	PRE-CESTTA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	MÉTODO (NORMA)
Hidrocarburos <i>total</i>	PRE-LAB/CESTTA/DE TINCC 1005	mg/kg	1285,07	2500	■ 10%



**OBSERVACIONES:**

- Muestra transportada en refrigeración
- Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en ~~toda las áreas de la industria,~~  
~~industrias urbanas, incluidas las estaciones de servicios. Uso agrícola. Tabla 6 EACNE.~~

**RESPONSABLES DEL INFORME:**

  
Dr. Humberto Morera  
RESPONSABLE TÉCNICO

  
Dr. Nancy Veloz M.  
JEFE DE LABORATORIO

 <b>LABORATORIO DE ANALISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN LAB-CESTTA</b>	<b>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</b>  <b>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</b>  <b>FACULTAD DE CIENCIAS</b> Panamericana Sur Km. 1 1/2 Teléfono: (03)2968-910 Ext. 169	 <b>ENSAYOS</b> No. OAE LE DC 04-008
---	--	---

**INFORME DE ENSAYO No. 1215**  
**ST: 10 – 0149 ANÁLISIS DE SUELOS**

**Nombre Particionario:** PROYECTO DE BIORREMEDIACIÓN SACRA 161  
**ddn:** Ing. Carlos Chávez  
**Dirección:** Panamericana Sur Km 1 1/2 Riobamba, Chimborazo

**FECHA:** 19 de Agosto de 2010  
**NUMERO DE MUESTRAS:** 1  
**FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:** 2010/08/12 - 12:30  
**FECHA DE MUESTREO:** 2010/08/11  
**FECHA DE ANÁLISIS:** 2010/08/12 - 2010/08/19  
**TIPO DE MUESTRA:** Suelo  
**CÓDIGO LAB-CESTTA:** LAB-S 2049-10  
**CÓDIGO DE LA EMPRESA:** PTA L3  
**PUNTO DE MUESTREO:** Plataforma # 3  
**ANÁLISIS SOLICITADO:** Tabla 6 EACOE  
**PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:** Ing. Carlos Chávez  
**CONDICIONES AMBIENTALES:** T ~~ambiente~~ <24.0 °C T ~~ambiente~~ > 20.0°C

**RESULTADOS ANALÍTICOS:**


PARÁMETROS	FEI-CESTTA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE	MÉTODO /NORMA
Hidrocarburos totales	FEI/LAB/CESTTA/06 TMECC 1005	mg/kg	1226,27	2500	▲ 10%
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	FEI/LAB/CESTTA/03 EPA SW-846 MÉTODO 8100	mg/kg	<0,5	<0	▲ 20%
Cadmio	FEI/LAB/CESTTA/03 EPA 200.9, APHA 200.9L 3111 E	mg/kg	<0,5	<0	▲ 20%
Níquel	FEI/LAB/CESTTA/01 EPA 200.9, APHA 200.9L 3111 E	mg/kg	<50	<50	▲ 20%
Plomo	FEI/LAB/CESTTA/09 EPA 200.9, APHA 200.9L 3111 E	mg/kg	<50	<100	▲ 20%

**OBSERVACIONES:**

- Muestra transportada en refrigeración
- Límites permisibles para la identificación y remediación de suelos contaminados en toda las áreas de la industria, hidrocarburos, incluidas las estaciones de servicios. Ver aplicada, Tabla 6 EACOE.

**RESPONSABLES DEL INFORME:**

  
**Dr. Mauricio Álvarez**  
**RESPONSABLE TÉCNICO**

  
**Dr. Nancy Valdez M.**  
**JEFE DE LABORATORIO**

## ANEXO 2. FOTOGRAFÍAS

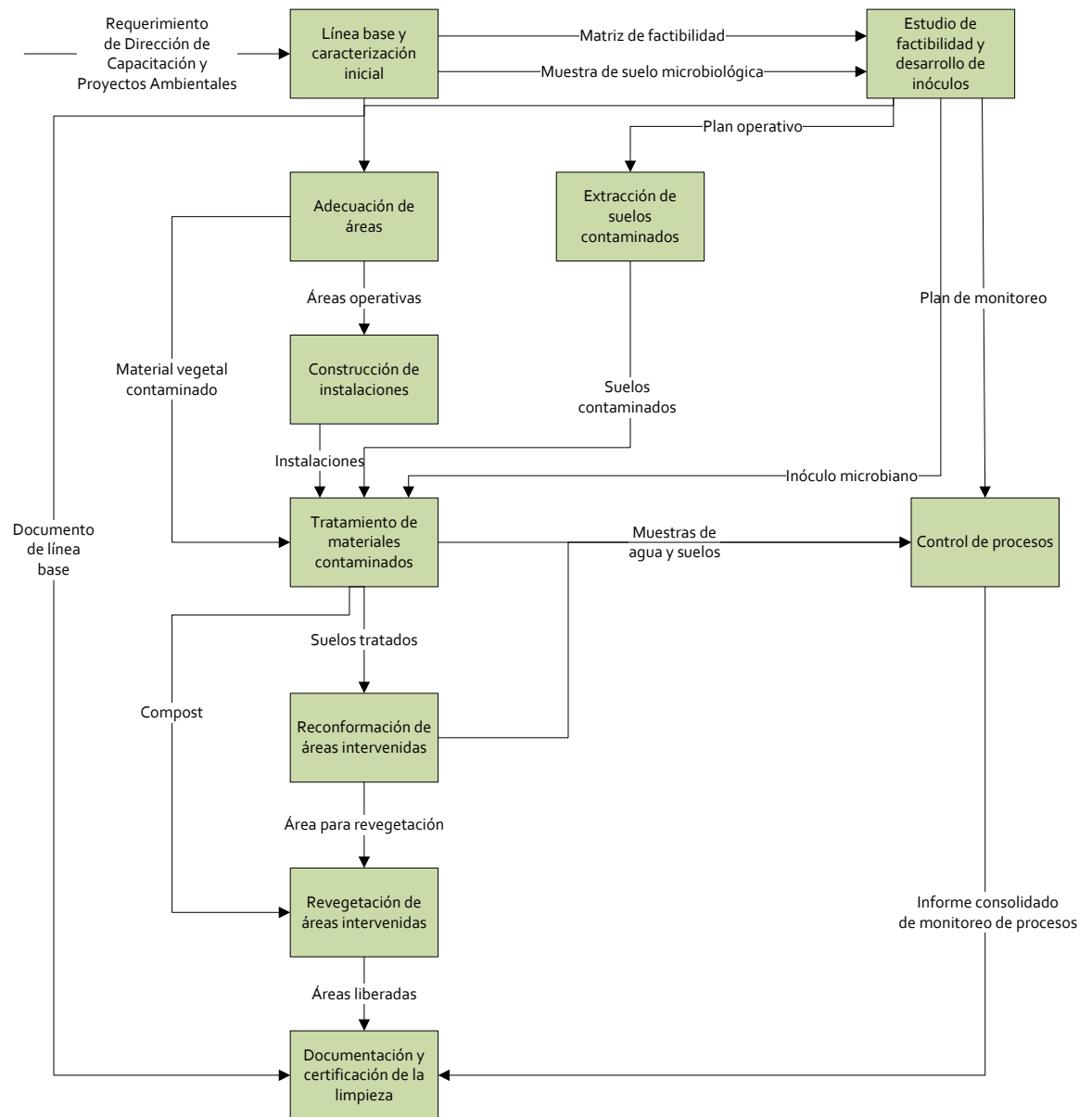


Equipos utilizados en el estudio, Colocación del punto de muestreo.



Medición de CO<sub>2</sub> in situ, Volteo de la biopila.

### ANEXO 3. DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO DE REMEDIACIÓN DE SACHA 161.



## ANEXO 4. MAPA DEL LUGAR EN ESTUDIO

